

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

INTERNEURONAS INHIBITORIAS Y NEURONAS DE

PROYECCIÓN EN LOS NÚCLEOS SENSITIVOS

TRIGEMINALES.

UN MODELO PARA EL ESTUDIO DE MECANISMOS INHIBITORIOS EN EL

DOLOR NEUROPÁTICO

TESIS DOCTORAL

Pedro Emilio Bermejo Velasco

Madrid, 2011



Facultad de Medicina
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia

Carlos Avendaño Trueba, Catedrático de Anatomía Humana y Neurociencia del Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid,

HACE CONSTAR: Que D. **Pedro Emilio Bermejo Velasco**, con DNI 03833603D, ha realizado bajo mi dirección el trabajo de Tesis Doctoral "*Interneuronas inhibitorias y neuronas de proyección en los núcleos sensitivos trigeminales. Un modelo para el estudio de mecanismos inhibitorios en el dolor neuropático*", que ha terminado satisfactoriamente.

Revisado el referido trabajo, quedo conforme con su presentación para ser juzgado. Y para que conste y surta los efectos oportunos, lo firmo en Madrid a 1 de febrero de 2011.




Fdo.: Carlos Avendaño

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

FACULTAD DE MEDICINA

Trabajo de investigación que presenta Pedro Emilio
Bermejo Velasco para optar al grado de Doctor en
Medicina y Cirugía por la Universidad Autónoma de
Madrid

Dirigido por el Profesor

Dr. Carlos Avendaño Trueba

Catedrático del Departamento de Anatomía, Histología y

Neurociencia de la Universidad Autónoma de Madrid.

Madrid, 2011

A mis padres

AGRADECIMIENTOS

Han pasado muchos años, once en concreto, desde que inicié mi investigación en neurociencia. No fue sino al conocer al Dr. Avendaño, quien posteriormente pasó a ser Carlos y a dirigir esta Tesis. Me gustaría darle sinceramente las gracias por confiar desde el primer momento en mí y guiarme como profesional y como persona. Gracias por tu motivación, comprensión, paciencia, seriedad, responsabilidad y confianza en aquellos momentos en los que no podía dedicar todo el tiempo que me gustaría a esta Tesis. Junto a él he crecido como estudiante de medicina, opositor al MIR, residente y ahora adjunto de neurología. Sin su ayuda y consejos este trabajo no se hubiese podido realizar.

También querría incluir en este agradecimiento a mis “maestros” de la “clínica”, de quienes destaco a Antonio García Merino, Carlos Escamilla, Antxón Zabala y Antonio Vaquero, por haber compartido tantas horas con ellos y de los que tanto he aprendido. Junto a ellos comencé a trabajar como residente en el Servicio de Neurología del Hospital Universitario Puerta de Hierro y me siento afortunado de haber podido aprender de sus ganas de saber. También me gustaría recordar a todos los compañeros que he tenido en el Sanatorio del Rosario y en el Hospital La Paz, así como a los numerosos residentes con los que he compartido tantas experiencias y de los que siempre he aprendido algo.

Quisiera también manifestar mi agradecimiento a los profesores del Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencia (primero Departamento de Morfología) con quienes tanto he compartido y de quienes tanto he aprendido en todos estos años, Francisco Clascá, Margarita Rodrigo, Estrella Rausell, Miguel Garzón y Carmen Cavada. Además me gustaría dar las gracias al Dr. Reinoso por sus enseñanzas. También a los compañeros Pilar, Jorge, Raquel, Yasmina, Agi, Alfonso y Andrés que siempre estaban ahí.

También quiero agradecer la ayuda de Rosa, Gemma, Begoña y Pay por enseñarme con paciencia en esos días de laboratorio y por ayudarme con el material de esta Tesis. A Rodrigo por su ayuda con el material de GABA y glicina.

Por último, quisiera recordar en estos agradecimientos a mis amigos Ricardo, Miguel, Nacho, Raúl y Marcos por estar ahí todos estos años, a Aurora por su continuo apoyo, por ser tan comprensiva y por aguantarme con esta Tesis que tanto tiempo le ha quitado, a mi hermana María por estar siempre ahí en lo bueno y en lo malo y, por supuesto a mis padres, sin los cuales mi proyecto profesional y personal no se hubiese podido realizar. Quiero agradecer el apoyo incondicional de mi madre para todas las decisiones que he tomado y por respaldarme sin fisuras a veces sin comprenderme. Mi último recuerdo

quiero que sea para mi padre, cuya larga enfermedad también fue el motivo por el que surgió mi pasión por el estudio del cerebro humano y decidió toda mi vida profesional. Sin su inquebrantable apoyo, hoy no sería quien soy.

Gracias a todos

ÍNDICE

ABREVIATURAS	XI
1. INTRODUCCIÓN	1
1.1 Sistema trigeminal de la rata	3
1.1.1 Subnúcleo principal del trigémino (Vp).....	5
1.1.2 Subnúcleo oral del trigémino (Vo).....	6
1.1.3 Subnúcleo interpolar del trigémino (Vip).....	6
1.1.4 Subnúcleo caudal del trigémino (Vc).....	7
1.1.5 Conexiones del sistema trigeminal.....	8
1.2 Procesamiento del dolor trigeminal en la rata	13
1.3 Modelos animales de dolor neuropático trigeminal	14
1.3.1 Elección de los animales y las especies.....	16
1.3.2 Patrón temporal y cronicidad de los modelos animales.....	17
1.3.3 Incidencia del dolor.....	17
1.3.4 Cuantificación de resultados.....	17
1.3.5 Modelo de constricción crónica del nervio infraorbitario (CCI-IoN)....	19
1.3.6 Evaluación de fármacos frente al dolor neuropático mediante modelos animales.....	20
1.4 Cambios en el sistema trigeminal asociados al dolor neuropático.	20
1.4.1 Dolor neuropático y sistema nervioso periférico.....	20
1.4.2 Cambios producidos en el sistema nervioso central. Sensibilización central.....	22
1.4.3 Reducción de la modulación inhibitoria. Papel de las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas en el dolor neuropático.....	24

1.5 Métodos de cuantificación.....	27
2. OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo general.....	33
2.2 Objetivos concretos.....	33
3. MATERIAL Y MÉTODOS.....	37
3.1 Animales de experimentación y grupos.....	39
3.2 Grupo A. Estudio morfométrico y de proyecciones.....	40
3.2.1. Inyección del trazador y sacrificio de los animales.....	40
3.2.2. Procesamiento del tejido.....	41
3.2.3. Microscopía y fotografía.....	44
3.2.4. Estereología.....	45
3.3 Grupo B ₁ . Cuantificación de las neuronas inhibitorias de GABA y glicina. Grupo control.....	50
3.3.1. Sujetos, fijación y preparación del tejido.....	50
3.3.2. Procesamiento del tejido.....	50
3.3.3. Microscopía, fotografía y densitometría.....	53
3.3.4. Estereología.....	55
3.4 Grupo B ₂ . Cuantificación de las neuronas inhibitorias de GABA y glicina. Grupo tratado con constricción crónica del nervio infraorbitario.....	58

3.4.1. Constricción crónica del nervio infraorbitario. Desarrollo de un modelo de dolor neuropático.....	58
3.4.2. Evaluación de los animales. Test nociceptivos.....	61
3.4.3. Fijación y procesamiento del tejido.....	63
3.4.4. Estereología.....	63
3.5 Grupo B₃. Cuantificación de las neuronas inhibitorias de GABA y glicina. Grupo tratado con gabapentina (GBP).....	63
3.5.1. Sujetos empleados y administración de GBP.....	63
3.5.2. Fijación y procesamiento del tejido.....	64
3.5.3. Estereología.....	64
3.6 Grupo B₄. Cuantificación de las neuronas inhibitorias de GABA y glicina. Grupo tratado intervenido mediante constricción crónica del nervio infraorbitario y tratado con GBP.....	65
3.6.1. Preparación de los animales.....	65
3.6.2. Fijación y procesamiento del tejido.....	66
3.6.3. Estereología.....	66
3.7 Grupo C. Análisis de las neuronas de proyección que expresan GABA y/o glicina.....	66
3.7.1. Inyección del trazador y sacrificio de los animales.....	66
3.7.2. Procesamiento del tejido.....	67
3.7.3. Microscopía, fotografía y análisis cuantitativo.....	68
3.8 Análisis estadístico y presentación de resultados.....	68
ANEXOS A MATERIAL Y MÉTODOS.....	69

4. RESULTADOS	73
4.1 Anatomía y proyecciones de los núcleos trigeminales	75
4.1.1. Los núcleos del trigémino: anatomía.....	75
4.1.2. Volumen de los diferentes núcleos del trigémino.....	79
4.1.3. Número total de neuronas de los núcleos del trigémino.....	82
4.1.4. Proyecciones al tálamo de los diferentes núcleos del trigémino.....	84
4.1.5. Proyecciones al cerebelo de los diferentes núcleos del trigémino.....	87
4.2 Las neuronas inhibitorias gabaérgicas y glicinérgicas	94
4.2.1. Neuronas gabaérgicas y glicinérgicas en el complejo trigeminal.....	94
4.2.2. Análisis densitométrico.....	102
4.2.3. Distribución laminar de las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas.....	103
4.2.4. Colocalización neuronal de la expresión de GABA y glicina.....	104
4.2.5. Ausencia de GABA y glicina en las neuronas de proyección talámica.....	108
4.3 Dolor neuropático experimental y núcleos del trigémino	109
4.3.1. Respuesta de las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas tras la CCI-IoN	109
4.3.2. Respuesta de las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas a la administración de GBP.....	117
4.3.3. Respuesta de las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas tras la CCI-IoN y administración de GBP.....	128
5. DISCUSIÓN	133
5.1 Consideraciones sobre métodos y diseños utilizados	135

5.1.1. Sobre los animales de experimentación.....	135
5.1.2. Marcado de las neuronas de proyección trigeminotalámicas y trigeminocerebelosas.....	135
5.1.3. Modelo de CCI-IoN.....	136
5.1.4. Tratamiento con GBP.....	138
5.1.5. Inmunohistoquímicas para GABA y glicina.....	138
5.1.6. Estereología.....	139
5.2 Los núcleos sensitivos trigeminales y número de neuronas.....	141
5.2.1. Volúmenes de los subnúcleos del complejo trigeminal.....	141
5.2.2. Número total de neuronas.....	142
5.2.3. Neuronas de proyección trigeminotalámica y trigeminocerebelosa.....	142
5.2.4. Expresión de GABA y glicina en el complejo sensitivo trigeminal.....	144
5.2.5. Relaciones estructurales y funcionales entre las neuronas de proyección, internucleares y neuronas intrínsecas.....	145
5.3 Modificaciones en la inhibición gabaérgica y glicinérgica en un modelo de dolor neuropático.....	147
5.3.1. Neurotransmisores GABA y glicina en los modelos de dolor neuropático.....	147
5.3.2. Receptores GABA.....	150
5.3.3. Reducción de la inmunorreactividad gabaérgica y glicinérgica.....	150
5.3.4. Modificaciones corticales en el modelo de CCI.....	153
5.4 Modificaciones en la respuesta de las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas a la administración de GBP.....	155
5.4.1. Mecanismos de acción antinoceptivos de la GBP además del sistema gabaérgico.....	155
5.4.2. Papel de la GBP en los sistemas gabaérgico y glicinérgico.....	157

6. CONCLUSIONES	159
7. BIBLIOGRAFÍA	163
8. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS	183

ABREVIATURAS

GLOSARIO DE ABREVIATURAS EMPLEADAS

AMPA: ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazol propiónico

CCI: constricción crónica (*chronic constriction injury*)

CCI-IoN: constricción crónica del nervio infraorbitario

CE: coeficiente de error

CE[V]: coeficiente de error estimado para el volumen

Cer: cerebelo

CS: colículo superior

CV: coeficiente de variación

CxM: corteza motora

CxSS: corteza somatosensorial primaria

CyO: citocromo oxidasa

DAB: diaminobenzidina

DEM: desviación estándar de la media

GABA: ácido gamma aminobutírico

GBP: gabapentina

Gly: glicina

HRP: peroxidasa de rabanillo (*horseradish peroxidase*)

IoN: nervio infraorbitario (*infraorbital nerve*)

NF: núcleo facial

mN: milinewton

NMDA: ácido N-metil-D-aspártico

NNBB: núcleos basales

NP: núcleo pontino

NPT: núcleo premotor del tronco del encéfalo

NR: núcleo rojo

OI: oliva inferior

PKs: proteincinasas

Pm: peso molecular

PoM: Núcleo posterior del tálamo

Vc: Núcleo caudal

Vc(c): Región caudal del Vc

Vc(i): Región intermedia del Vc

Vc(r): Región rostral del Vc

Vip: Núcleo interpolar

VL: núcleo ventrolateral del tálamo

Vo: Núcleo oral

Vp: Núcleo principal

VP_d: región dorsal del Vp

VP_v: región ventral del Vp

VPM: Núcleo ventral posteromedial del tálamo

VPM_{dm}: región dorsomedial del VPM

VPM_{vl}: región ventromedial del VPM

ZI: zona incerta

1. INTRODUCCIÓN

1.1 SISTEMA TRIGEMINAL DE LA RATA

Los núcleos del sistema sensorial del trigémino de los roedores han sido objeto de interés por parte de los anatomistas del sistema nervioso desde hace más de un siglo debido a la alta especialización y organización topográfica y funcional de este sistema. El complejo trigeminal está muy desarrollado en estos animales y muy especialmente se encarga de transmitir la información sensitiva procedente de las vibrisas, las cuales el animal utiliza en gran medida en sus actividades cotidianas, como el comportamiento exploratorio o la alimentación.

Hasta el momento actual se ha obtenido mucha información acerca de la histología, anatomía química, conexiones y propiedades electrofisiológicas del complejo trigeminal. La riqueza de los estudios descriptivos de los núcleos del trigémino contrasta con la escasez de datos cuantitativos. Se han obtenido diversas medidas de las aferentes primarias (Jacquin et al., 1993; Shortland et al., 1996) y neuronas individuales (Jacquin et al., 1996; Yoshida et al., 1998) con tinción por el método de Golgi o por inyecciones individuales y reconstruidas por métodos informáticos. Algunos datos morfométricos también están disponibles sobre los botones presinápticos de las fibras aferentes (Bae et al., 2000) y sobre algunos parámetros básicos como el volumen de los núcleos del trigémino, el número total de células y el número de diferentes subpoblaciones neuronales específicas (Avendaño et al., 2005).

El interés en un mayor conocimiento anatómico de estos núcleos se ha mantenido hasta la actualidad ya que el sistema trigeminal está constituyendo un modelo para estudiar el desarrollo neuronal (Jacquin et al., 1996), el procesamiento de la información sensorial (Szwed et al., 2003; Jones et al., 2004) o sensitivomotora (Tsuboi et al., 2003) y de la plasticidad neuronal (Melzer y Smith, 1998; Machín et al., 2004), para desarrollar diversos modelos de dolor, para el estudio de la fisiopatología de la migraña y otras cefaleas trigeminoautonómicas (Ashkenazi y Young, 2004; Buzzi y Tassorelli, 2010) y para el diseño de sensores artificiales en robótica (Fend et al., 2003).

Cada folículo de cada vibrisa está innervado de un modo muy abundante por nervios superficiales y profundos, recibiendo cada uno de estos últimos aproximadamente 250 fibras nerviosas, un tercio de las cuales son amielínicas (Klein et al., 1988). Esta intensa innervación da una idea del importante papel de las vibrisas como fuente de entrada sensorial en las ratas y otros roedores. Las ratas pueden extender sus vibrisas hasta aproximadamente 5 cm por delante de ellas para detectar objetos y además las mantienen en continuo movimiento para obtener información sensorial para el apoyo y ayuda para la marcha. Se ha sugerido que las ratas, a través de sus vibrisas son capaces de detectar

entre diferentes texturas de superficies a un nivel comparable al que son capaces los primates mediante las puntas de sus dedos (Carvell y Simons, 1990).

Dependiendo de su localización, los receptores faciales son inervados por una de las tres ramas del trigémino. En la rata, como en otros animales, la rama oftálmica proporciona inervación al dorso de la cabeza y vibrisas supraorbitarias, la córnea, la conjuntiva, la piel del dorso de la nariz y la mucosa nasal. La división maxilar inerva el labio superior, las vibrisas del morro, la porción lateral de la nariz y la mucosa del maxilar y de los dientes superiores. La rama mandibular inerva la articulación temporomandibular, la piel que recubre la mandíbula y el labio inferior y la mucosa intraoral de la mandíbula, dientes inferiores y el tercio anterior de la lengua. El nervio infraorbitario (IoN) pertenece a la rama maxilar del trigémino y se encarga de inervar la zona de vibrisas.

Las neuronas primarias de la vía trigeminal se sitúan en el ganglio trigeminal y en el núcleo mesencefálico del trigémino. Las neuronas del ganglio trigeminal son análogas a las neuronas de los ganglios raquídeos, es decir, son pseudomonopolares (Lieberman, 1976) y pueden ser clasificadas en tipo A y B (Lagares y Avendaño, 2000), dependiendo si son grandes y con prolongaciones mielinizadas gruesas o medianas, o pequeñas y con prolongaciones amielinizadas o escasamente mielinizadas. En el ganglio trigeminal existe una cierta somatotopía. De esta forma, las células que inervan la región oftálmica se sitúan anteromedialmente y las de la región mandibular posterolateralmente. También existe una organización dorsoventral, estando las células que inervan regiones dorsales periféricas como la córnea dorsalmente y las que inervan estructuras ventrales, centralmente (Grant et al., 1979). Sin embargo, esta somatotopía es aproximada y hay un considerable solapamiento entre los distintos territorios.

Estas neuronas proyectan sus prolongaciones centrales hacia el complejo ipsilateral de los núcleos trigeminales del tronco cerebral. El complejo nuclear trigeminal es una columna de células que se extienden a lo largo de la porción lateral del tronco del encéfalo desde el puente hasta confundirse con el asta dorsal de la médula cervical. La nomenclatura de Olszewski ha sido utilizada para describir a la porción más rostral como el núcleo sensitivo principal del trigémino (Vp) y al resto como el núcleo espinal del trigémino. Además existiría otro núcleo localizado en el mesencéfalo que se denomina núcleo mesencefálico, que en realidad incluye neuronas primarias internalizadas, y que están íntimamente relacionadas con el núcleo motor del trigémino e implicadas en el reflejo masticatorio. El núcleo espinal a su vez se subdivide de rostral a caudal en subnúcleos oral (Vo), interpolares (Vip) y caudal (Vc) (Olszewski et al., 1950). Dentro del complejo trigeminal también se encuentran los subnúcleos motor, medial al Vp, el supratrigeminal,

en el borde dorsomedial del Vp, el intertrigeminal, que se localiza entre el núcleo motor y el Vp, y el paratrigeminal que se sitúa en la superficie lateral medial incluido parcialmente en el tracto trigeminal espinal. Los núcleos supratrigeminal e intertrigeminal contienen neuronas gabaérgicas y reciben proyecciones de la capa marginal del tracto espinal del trigémino ipsilateral y envían sus proyecciones al núcleo motor trigeminal del lado contralateral. Se ha sugerido que algunas de estas neuronas gabaérgicas pueden representar neuronas premotoras que reciben impulsos nociceptivos para provocar el reflejo de apertura mandibular a través de la inhibición de las motoneuronas encargadas del cierre mandibular del núcleo motor del trigémino (Li et al., 2005).

1.1.1 Subnúcleo principal del trigémino (Vp)

El Vp se encuentra situado en la región más rostral del complejo trigeminal del tronco, concretamente en la región lateral del puente. Se limita lateralmente por el tracto del trigémino y medialmente por los fascículos de la raíz motora del trigémino. Rostralmente limita con el núcleo motor trigeminal y caudalmente con la región más rostral del núcleo facial. Si se realiza un corte coronal, el Vp es alargado dorsoventralmente y se distinguen dos dilataciones, una dorsal y otra ventral, separadas por un suave estrechamiento central. La porción ventral se extendería más caudalmente que la región dorsal y dejaría una región de transición oblicua con el Vo.

La rama mandibular del nervio trigémino inerva la región dorsal mientras que las ramas maxilar y oftálmica llegan a la región ventral, en la cual se encuentran los *barriletes* (Bates y Killackey, 1985) que representan anatómicamente las vibrisas y que apenas son distinguibles en los cortes coronales por no ser perpendiculares al eje mayor. Estos barriletes tienen forma de tubo cilíndrico en los cuales existe un borde densamente poblado de células y un hueco paucicelular en la región central. La región de barriletes del Vp tiene tres tipos celulares distintos: las neuronas barrilete, las neuronas interbarrilete y las neuronas gabaérgicas (Ma, 1991). Las primeras tienen sus árboles dendríticos confinados a un solo barrilete (Arends y Jacquin, 1993) mientras que las segundas extienden sus dendritas a varios barriletes (Nasution y Shigenaga, 1987) y las últimas son de menor tamaño y participan en circuitos inhibitorios locales.

Se conoce sobradamente que el Vp proyecta fundamentalmente al núcleo ventral posteromedial (VPM) contralateral del tálamo, aunque también se han descrito proyecciones a otras regiones mesencefálicas o diencefálicas, al núcleo talámico posterior

(PoM) (Chiaia et al., 1991), al cerebelo (Mantle-St John y Tracey, 1987), al núcleo geniculado medial (Peschanski, 1984), al colículo superior (Huerta et al., 1983), a la parte ventral de la zona incerta (Nicoletis et al., 1992) y al núcleo pretectal anterior (Yoshida et al., 1992). Las terminaciones de estas proyecciones en el VPM se encuentran muy agrupadas dando lugar a estructuras denominadas *barriloides* mientras que las terminaciones en el PoM son más dispersas y no forman ninguna estructura definida (Veinante y Deschênes, 1999).

Esta área de barriletes recibe una importante proyección descendente desde la corteza cerebral contralateral que terminan en las zonas entre los barriletes (Jacquin et al., 1990b).

1.1.2 Subnúcleo oral del trigémino (Vo)

El Vo constituye la región más rostral del núcleo espinal y limita rostralmente con la parte caudal del Vp coexistiendo en posición rostrocaudal con el núcleo facial. Su límite dorsomedial es difícil de delimitar respecto a la formación reticular y su límite ventromedial viene determinado por un haz de fascículos mielinizados que pertenecen a la formación reticular parvocelular pontina y que conectan al Vo con las fibras perifaciales del núcleo facial.

Este subnúcleo proyecta al tálamo y al cerebelo aunque de un modo menos marcado que el Vp así como a la médula espinal y a otras estructuras del tronco del encéfalo (Jacquin y Rhoades, 1990; Devoize et al., 2010).

1.1.3 Subnúcleo interpolar del trigémino (Vip)

El Vip se sitúa en el núcleo espinal del trigémino entre los núcleos Vo y Vc, de donde recibe su nombre. Su límite caudal es oblicuo. Esta región caudal del Vip corresponde a la respuesta de vibras y en ella se distinguen dos divisiones citoarquitectónicas: una zona parvocelular que ocupa la región caudal del núcleo y una zona magnocelular que se corresponde a la zona rostral del núcleo.

Desde el Vip se extienden proyecciones al VPM contralateral al igual que sucede con el Vp, pero a regiones no solapantes sino complementarias (Pierret et al., 2000; Veinante et al., 2000). Comparando las proyecciones de ambos subnúcleos, las del Vp se dirigen a los barriloides del VPM, mientras que las del Vip quedan fundamentalmente restringidas a la porción ventral lateral del VPM, donde se aprecia un descenso de la concentración de

barriloides en la tinción citocromo oxidasa (Williams et al., 1994; Pierret et al., 2000). Además, el Vip proyecta al cerebelo de forma directa e indirectamente a través del núcleo olivar y al colículo superior (Bruce et al., 1987). También se han descrito proyecciones al núcleo talámico posterior, a la zona incerta y al núcleo pretectal anterior (Waite y Tracey, 1995).

Se han evidenciado diversos tipos celulares en el Vip: células de respuesta a multivibrisa, que proyectan al tálamo o al cerebelo, y células de respuesta monovibrisa, que forman parte de circuitos locales y proyectan a otras regiones del complejo trigeminal (Jacquin et al., 1986; Jacquin et al., 1989a; Jacquin et al., 1989b; Jacquin et al., 1990a).

1.1.4 Subnúcleo caudal del trigémino (Vc)

Se han descrito numerosas propiedades que este núcleo comparte con el asta dorsal de la médula espinal que le han llevado en algunas ocasiones a ser considerado como una prolongación de ésta (Dubner y Bennett, 1983) a pesar de que también existen diferencias importantes en cuanto a sus diferentes funciones y propiedades químicas como la diferente expresión de la sustancia P y CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) (Polgár y Antal, 1995; Bereiter et al., 2000).

El Vc se extiende desde el nivel del óbex en su extremo rostral hasta la región cervical de la médula espinal, donde continúa con el asta dorsal. En la región dorsal, la zona de transición se encuentra flanqueada lateralmente por la parte caudal del Vip, está laminado en la zona caudal y se estrecha gradualmente hasta mezclarse sin un límite claro con el asta dorsal cervical superior. Al igual de lo que sucede en la médula espinal, en el Vp se aprecia una clara disposición laminar, con una capa marginal denominada lámina I en la región más lateral del núcleo, una sustancia gelatinosa, denominada lámina II y una capa de células grandes que está formada por las láminas III y IV (Olszewski, 1950). Algunos autores han sugerido la existencia de una quinta lámina denominada lámina V que únicamente existiría en la región más rostral, como una forma de prolongación del núcleo reticular dorsal.

La lámina I se compone de varios tipos celulares, de los cuales destacan las células multipolares que se alinean paralelamente al tracto espinal (Sedlacek et al., 2007). La lámina II se compone de pequeñas células ovales o fusiformes. Respecto a las proyecciones en la lámina I lo hacen al VPM del tálamo, al núcleo gelatinoso (Yoshida et al., 1991), al núcleo intralaminar y al posterior del tálamo (Peschanski, 1984). Las láminas I y II también proyectan a los núcleos del tracto solitario (Menétry et al., 1992) y

a la zona incerta. La capa magnocelular proyecta al núcleo facial (Erzurumlu y Killackey, 1979) y a otros núcleos trigeminales, las cuales parecen modular las respuestas de estos otros núcleos (Hallas y Jacquin, 1990). En la transición entre el Vip y el Vc existe un tipo de neuronas sensitivas que no están presentes en otras porciones del Vc y que se encargan de la homeostasis de los fluidos de la superficie ocular (Hirata et al., 2004).

Desde el punto de vista funcional se diferencian dos zonas en el Vc. Por un lado, las láminas I y II se encargarían de la transmisión nociceptiva, mientras que las láminas III y IV lo harían de la sensibilidad táctil y tendrían un papel importante para las funciones sensorimotoras reflejas. La lámina V contendría las neuronas WDR (neuronas nociceptivas de amplio rango dinámico) que responden tanto a estímulos nociceptivos como táctiles.

El Vc ha ganado importancia en los últimos años debido a que se ha demostrado que ocupa un papel central en la transmisión de impulsos nociceptivos y su implicación en numerosos procesos algésicos. De este modo, se ha reconocido el papel de este subnúcleo en la neuralgia del trigémino (Tsubokawa et al., 1987), el dolor y la fobia en la migraña (Goadsby et al., 2009; Okamoto et al., 2010), el dolor de origen dental (Fan et al., 2010), el dolor secundario a la queratitis ocular (Tashiro et al., 2010), el dolor procedente de la articulación temporomandibular (Wang et al., 2009) y el dolor de origen cervical (Vernon et al., 2009).

1.1.5 Conexiones del sistema trigeminal

Respecto a su proyección axonal, las neuronas de los distintos subnúcleos trigeminales pueden ser clasificadas como *neuronas de proyección*, si envían todas o algunas de las ramas de su axón fuera del complejo trigeminal, *intersubnucleares*, si envían ramas de su axón a otras divisiones del complejo trigeminal, e *intrínsecas*, si los axones se distribuyen principal o exclusivamente en la misma región en la que se sitúa el soma neuronal. Estos distintos tipos de neuronas se distribuyen heterogéneamente en los distintos núcleos.

Las neuronas de proyección pueden alcanzar una gran cantidad de dianas. Entre ellas, la estructura que recibe más inervación es el tálamo (Fukushima y Kerr, 1979; Kemplay y Webster, 1989; Williams et al., 1994; Veinante et al., 2000; Negredo et al., 2009), aunque existe un gran número de estructuras que también reciben información como la zona incerta, el pretectum, colículo superior (Feldman y Kruger, 1980; Yoshida et al., 1992; Veinante et al., 2000), los núcleos cocleares y el colículo inferior (Li and Mizuno, 1997; Haenggeli et al.), el cerebelo y el complejo olivar inferior (Mantle-St John y Tracey,

1987; Molinari et al., 1996; Yatim et al., 1996), el complejo parabraquial (Burton et al., 1979; Feil y Herbert, 1995; Pinto et al., 2006), los núcleos motores del trigémino, del facial y del hipogloso (Li et al., 1995; Pinganaud et al., 1999), la formación reticular del puente y del bulbo (Shammah-Lagnado et al., 1992; Esser et al., 1998), y la médula espinal (Phelan y Falls., 1991). Las diferentes neuronas de proyección se distribuyen heterogéneamente en los diferentes núcleos del trigémino y junto a sus distintas dianas forman una compleja red que se encarga de la transmisión de la información sensorial desde las distintas áreas craneales cuya sensibilidad se transmite a través del sistema trigeminal. Esta red se esquematiza en la figura 1.

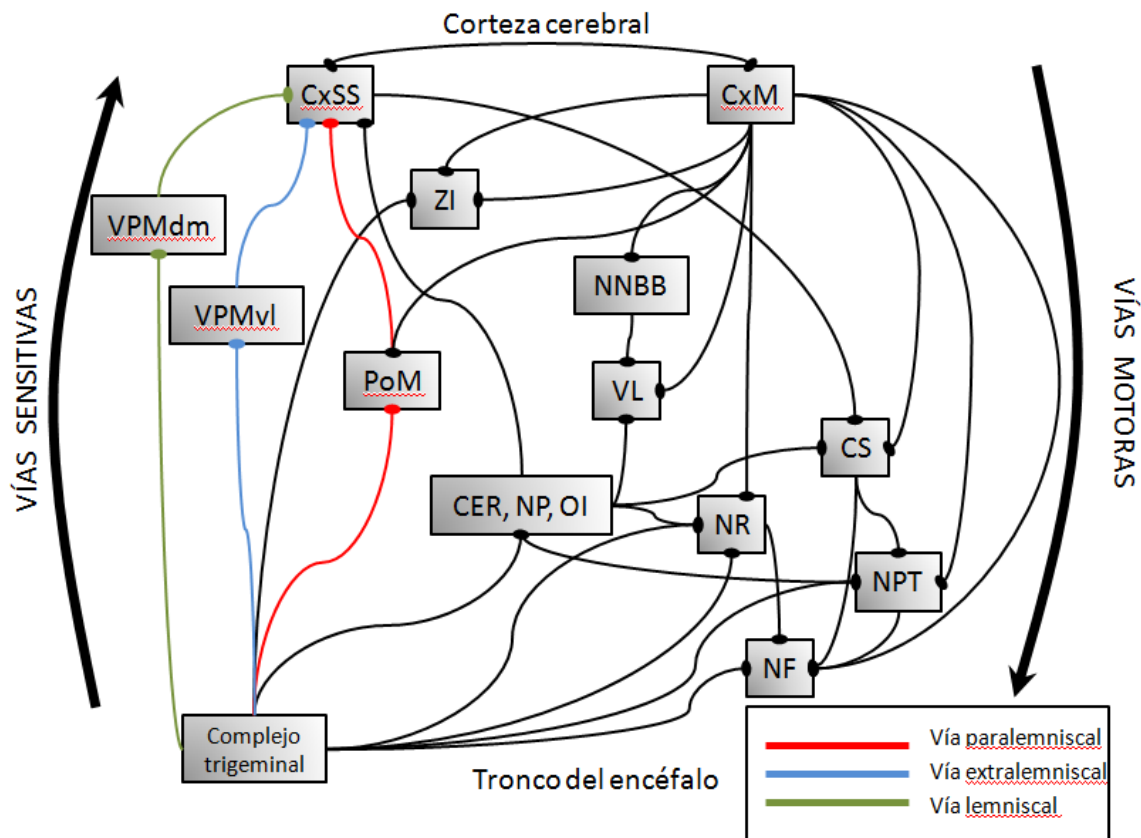


Figura 1. Esquema de la transmisión de la información sensorial desde las distintas áreas craneales cuya sensibilidad a través del sistema trigeminal. Cer= cerebelo; CS= colículo superior; CxSS= corteza somatosensorial primaria; CxM= corteza motora; NNBB: núcleos basales; NF= núcleo facial; NPT= núcleo premotor del tronco del encéfalo; NR= núcleo rojo; OI= oliva inferior; PoM= núcleo talámico posterior; VL: núcleo ventrolateral del tálamo; VPMdm= región dorsomedial del VPM; VPMvl= región ventromedial del VPM; ZI= zona incerta. (Diamond et al., 2008).

Las neuronas internucleares están presentes en todos los núcleos trigeminales y sus axones se distribuyen en dirección ascendente o descendente, algunas de las cuales pueden llegar incluso a niveles mesencefálicos o diencefálicos (Falls, 1984; Jacquin et al., 1989a; Buisseret-Delmas et al., 1997; Voisin et al., 2002). Se ha demostrado la existencia de densas proyecciones desde el Vc al resto de los subnúcleos del complejo trigeminal así como conexiones recíprocas entre los núcleos Vo y Vip, Vip y Vc, y Vc y Vo (Ikeda et al., 1984; Nasution y Shigenaga, 1987; Voisin et al., 2002). Las proyecciones descendentes desde el Vp a los subnúcleos espinales son escasas, aunque se ha demostrado que existen conexiones descendentes que viajan desde el tálamo y los colículos hasta los diferentes subnúcleos espinales del trigémino (Jacquin et al., 1989a; Jacquin et al., 1990a). Por su lado, las proyecciones desde los subnúcleos espinales al Vp son considerables e incluyen conexiones excitatorias e inhibitorias. Estas proyecciones surgen de todas las láminas del Vc salvo de la lámina II (Saporta y Kruger, 1977).

Las proyecciones al Vc proceden fundamentalmente de los núcleos Vip y Vo. Desde el Vip existen proyecciones a la lámina magnocelular del Vc y a los núcleos Vo y Vp. Las neuronas localizadas en la porción dorsal del Vc y del Vip proyectan a las regiones rostrales del Vp mientras que las porciones ventrales del Vc y del Vip lo hacen a las regiones ventrales del Vp.

Desde el punto de vista funcional, el complejo trigeminal puede dividirse esquemáticamente en dos grandes grupos: la discriminación sensorial, representada por el Vp, el Vip y la lámina I del Vc y la función reflexiva sensorimotora, representada por el Vo y las láminas III y IV del Vc (Bae et al., 2005).

Tras la primera evidencia de que existen conexiones inhibitorias internucleares en el complejo trigeminal del tronco (Timofeeva et al., 2004), se ha demostrado la existencia de dos categorías de células sensibles a las vibrisas en los núcleos trigeminales: unas células glutamatérgicas de proyección hacia el tálamo, el cerebelo y el colículo superior (Lavalée et al., 2005) y unas células locales que proyectan hacia otros subnúcleos trigeminales (Jacquin et al., 1989; Moon et al., 2008).

El Vp recibe proyecciones gabaérgicas (inhibitorias) y glutamatérgicas (excitatorias) localizadas en la región caudal del Vip y en el Vc respectivamente. La concentración más densa de células gabaérgicas y glicinérgicas se encuentra en el Vip y en el Vc mientras que el Vp exhibe la más baja (Avendaño et al., 2005). Estos resultados sugieren la posibilidad de que el control de las células de proyección intersubnuclear podría inhibir la transmisión sensorial en la vía lemniscal a través de GABA (*ácido gamma-aminobutírico*) y glicina (Furuta et al., 2008). Esta transmisión sináptica intersubnuclear

está mediada por receptores glutamatérgicos AMPA y NMDA y por receptores GABA_A y glicina (Han et al., 2008). La figura 2 representa las proyecciones de las neuronas internucleares del núcleo del trigémino.

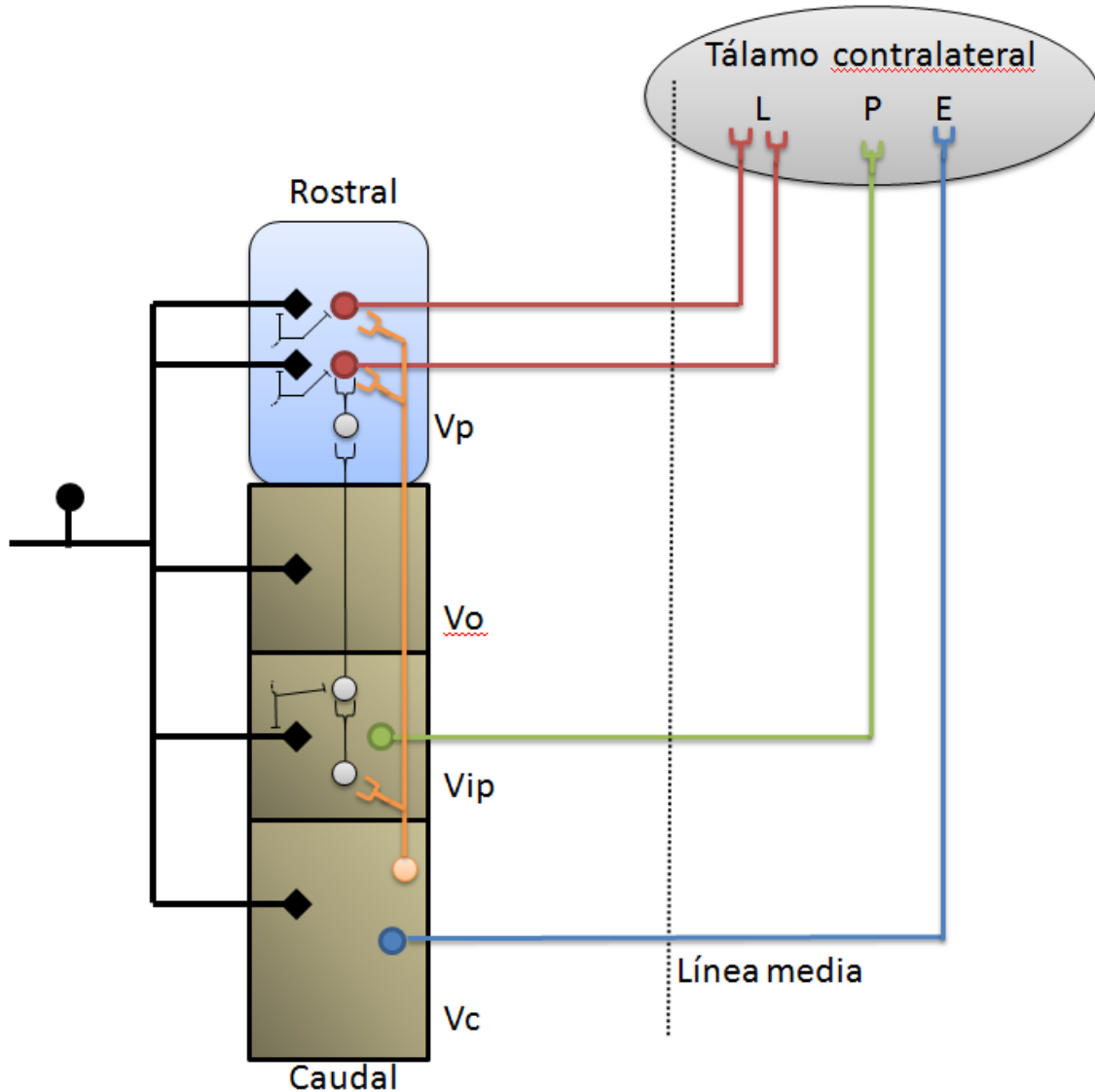


Figura 2. Representación de las proyecciones de las neuronas internucleares del núcleo del trigémino (Modificado de Timofeeva et al., 2004), añadiendo las posibles interneuronas inhibitorias. Además, se muestran las aferencias inhibitorias directas –procedentes de neuronas no determinadas- sobre las fibras aferentes primarias, responsables de la inhibición de la neurotransmisión de aferentes primarios hacia las células postsinápticas (Bae et al., 2005; Moon et al., 2008). Las interneuronas que están marcadas en naranja son excitatorias y utilizan glutamato como neurotransmisor. L=información lemniscal; P= información piramidal; E= información extralemniscal.

Respecto a las neuronas intrínsecas, aún no queda claro si tienen sus proyecciones axonales confinadas dentro del núcleo del trigémino o existen neuronas capaces de proyectar fuera de él (Jacquin et al., 1989a). Sin embargo, se ha demostrado un elevado número de neuronas que expresan GABA o GAD en todos los subnúcleos del trigémino (Ottersen y Storm-Mathisen, 1984; Haring et al., 1990; Ginestal y Matute, 1993) y que estas neuronas no pertenecen al grupo de neuronas internucleares (Haring et al., 1990). Otra población neuronal ha demostrado expresar glicina en todos los subnúcleos de la rata (Rampon et al., 1996) y un número indeterminado de ellos colocalizan con GABA (Dumba et al., 1998; Wang et al., 2000; Avendaño et al., 2005).

El núcleo del trigémino además de modular la información aferente, también actúa como una estación de relevo desde donde surgen axones que se decusan y proyectan al tálamo contralateral, al núcleo ventral posteromedial (VPM) y a la porción medial del PoM. En las regiones del tálamo donde llega la información de las vibrisas, se encuentran unos agregados neuronales que se denominan barriloides (Van der Loos, 1976). Del núcleo del trigémino surgen dos vías ascendentes hacia el tálamo contralateral: una vía lemniscal que lleva información sensorial desde el Vp a la zona de barriloides del núcleo VPL y termina en la zona granular de la corteza de barriles y una vía paralemniscal que lleva información sensorial desde el Vip al PoM contralateral y termina en la zona disgranular del campo de barriles de la corteza. Ambos sistemas no están completamente aislados entre sí sino que existen abundantes conexiones que van de los subnúcleos Vc y Vip al Vp (Jacquin et al., 1990a) que conectan la información ascendente de las vías lemniscal y paralemniscal (Timofeeva et al., 2004).

Desde los núcleos VPM y POM del tálamo surgen proyecciones que terminan, entre otras zonas en el área de barriles de la corteza somatosensorial primaria (CxSS), denominada así porque las neuronas están agrupadas “como barriles” distinguiéndose en estas estructuras una zona central de menor densidad celular rodeada por un círculo de mayor densidad. De esta forma se mantiene una organización topográfica entre los barriletes trigeminales, los barriloides talámicos y los barriles corticales. Diversos estudios han demostrado que existe una relación uno a uno entre cada una de las vibrisas y su correspondiente barril con lo que a cada uno de ellos le correspondería una vibrisa “mistacial” o principal contralateral (Woolsey y Van der Loos, 1970). Sin embargo, algunas de las proyecciones terminan en más de un barril.

1.2 PROCESAMIENTO DEL DOLOR TRIGEMINAL EN LA RATA

Las diferentes ramas del nervio trigémino recogen la sensibilidad procedente de diversos territorios de la piel y de las vibrisas. Estas últimas suponen una importante fuente sensorial para las ratas y otros roedores que permite compensar parcialmente la escasa visión de estos animales en un entorno nocturno (Vincent, 1912). Los receptores del sistema trigeminal se encuentran en la piel de la cara, en la mucosa oral y nasal y en estructuras más profundas como el tejido subcutáneo, músculos y tendones faciales. Las neuronas del sistema nervioso periférico responsables de la detección y función de los estímulos dolorosos se denominan nociceptores. Como cualquier neurona aferente primaria, presentan una prolongación que se bifurca en una prolongación periférica que recorre los nervios sensitivos, y una prolongación central que entra en el tronco del encéfalo a través de la raíz del trigémino y termina en el complejo trigeminal.

De acuerdo con el diámetro, la mielinización y la velocidad de conducción de las fibras sensitivas cutáneas, éstas se dividen en A β , A δ y C. En condiciones fisiológicas únicamente las fibras A δ y C pueden transmitir información nociceptiva. Las fibras A δ son responsables del dolor agudo, mientras que las fibras C son de conducción más lenta. En condiciones no fisiológicas, principalmente en presencia de inflamación tisular o tras una lesión de los nervios periféricos, pueden producirse alteraciones neuroquímicas de las neuronas A β y transmitir dolor (Day et al., 2001).

El dolor transmitido a través del nervio trigémino llega al complejo trigeminal ipsilateral, en el cual existe una apreciable somatotopía. De este modo, las neuronas que inervan la región oftálmica y maxilar se sitúan anteromedialmente y las que inervan la región mandibular lo hacen posterolateralmente. Dorsoventralmente las células se encuentran organizadas según inervan regiones periféricas dorsales o ventrales (Grant et al., 1979).

El Vc ha sido considerado como la vía de entrada de la sensibilidad térmica y nociceptiva a través de axones poco mielinizados o amielínicos (Crissman et al., 1996) y desde aquí se envía esta información a niveles superiores. Desde este núcleo existen proyecciones contralaterales hacia el VPM y el núcleo posterior del tálamo (POm), específicamente hacia las láminas I, III y V. Existe una distribución topográfica de modo que las neuronas situadas en la región dorsomedial de este núcleo proyectan a la región medial del VPM, las situadas en las partes intermedias proyectan al VPM intermedio y las situadas en la región ventrolateral proyectan al VPM lateral (Guy et al., 2005).

Las láminas I y II contienen numerosas neuronas nociceptivas (Price et al., 2003) que son la principal zona de terminación de las aferencias primarias nociceptivas de las fibras C y

las fibras A δ . Por su parte las láminas III y IV reciben fundamentalmente entradas mono y polisinápticas no nociceptivas de las fibras A β (Willis y Coggeshall, 1978). El Vc juega un papel crucial en los mecanismos de dolor orofacial. Por su parte las neuronas WDR, situadas en la lámina V, y en menor medida en la III y la IV, son las responsables de discriminar aspectos sensoriales del dolor.

Desde el complejo trigeminal, la información nociceptiva asciende a través de las conexiones trigeminales ya comentadas anteriormente hasta el tálamo (ver *conexiones del sistema trigeminal*) y desde allí hasta la corteza cerebral. El VPM constituye la vía primaria somatosensorial, proyecta a la capa IV y a la parte más profunda de la III de la CxSS y puede enviar información de las vibrisas al campo de barriles en tan solo 8 ms. Por su parte, el POm proyecta preferentemente a la capa VI de la CxSS y envía señales a las regiones entre los barriles. Forma una vía somatosensorial secundaria que responde a la estimulación de las vibrisas con una latencia de 15-20 ms y la mayoría de ellas forman parte de una vía de comunicación interbarril (Diamond, 1995).

Desde la zona de barriles cortical, la información somatosensorial es enviada a otras áreas corticales. La CxSS mantiene conexiones recíprocas ipsi- y contralaterales con la corteza motora primaria, el área somatosensorial secundaria y la corteza perirrinal. Estas conexiones se originan en las capas III y IV y se extienden a las capas II, IV y V de la corteza de barriles adyacente. Por otro lado se han encontrado conexiones entre el área de vibrisas de la corteza motora primaria y los núcleos talámicos ventral lateral y central lateral y la zona incerta ipsilateral.

En lo referente al nivel cortical, existen varias regiones implicadas directamente en el procesamiento del dolor. Entre ellas se encuentran las cortezas somatosensoriales primaria y secundaria, la corteza insular posterior y la corteza cingular anterior. Todas ellas proyectan directamente a la sustancia gris periacueductal y ponen en marcha potentes circuitos analgésicos descendentes que se originan en esta región mesencefálica (Willis y Westlund, 1997).

1.3 MODELOS ANIMALES DE DOLOR NEUROPÁTICO TRIGEMINAL

Los síndromes de dolor crónico ocurren frecuentemente en el territorio del nervio trigémino y existen encuestas de prevalencia que incluso dan cifras de 25-30% de dolor orofacial en la población general (Macfarlane et al., 2006). Además el sistema trigeminal también parece estar relacionado con otros tipos de dolor hemifacial y hemicraneal como el dolor dental, el dolor de la articulación temporomandibular, la migraña y un grupo

heterogéneo de cefaleas denominadas trigémino-autonómicas que incluyen la hemicránea, el SUNCT o la cefalea en racimos entre otros. Los mecanismos de dolor neuropático son múltiples y aún no son del todo comprendidos. Además el conocimiento del mismo es aún menor cuando se trata de dolor crónico en las regiones orofaciales.

Hasta la fecha, se han desarrollado varios modelos de dolor neuropático en nervios espinales en roedores, generalmente basados en lesiones infligidas en los nervios en distintos niveles. Uno de los modelos que más éxito obtuvo fue la colocación de ligaduras de cromo en el nervio ciático de la rata (Bennett y Xie, 1988), lo cual provocaba un comportamiento análogo a las condiciones de dolor neuropático humano. Las ratas adoptaban una posición protectora de la zona y tenían umbrales disminuidos para el calor, el frío y los estímulos mecánicos. Además destacaban dos respuestas que son propias del dolor neuropático: la alodinia, que consiste en percibir un estímulo no nociceptivo como dolor, y la hiperalgesia, que consiste en percibir un estímulo nociceptivo con mayor dolor que le correspondería.

Los estudios posteriores en el modelo de dolor neuropático por compresión del nervio con ligaduras de cromo indicaban una respuesta inmune idiosincrásica provocada por la sutura crómica que jugaba un papel importante en el desarrollo del modelo algésico (Maves et al., 1993) dando lugar a una inflamación con aumento del tamaño del nervio, compresión y axotomía. En la mayoría de los modelos de dolor neuropático, las lesiones experimentales de las fibras aferentes incluyeron una variedad de procesos como la transección nerviosa, rizotomía dorsal (modelos de desaferentización) (Lombard et al., 1979) o CCI de un tronco nervioso o parte de él (Bennett y Xie, 1988). Otros modelos animales de dolor neuropático que simulan situaciones humanas como el dolor por diabetes mellitus y por quimioterapia también han sido reproducidos en animales mediante inyecciones de estreptozotocina (Ahlgren y Levine, 1993) y los modelos de neuropatías dolorosa por paclitaxel y vincristina (Flatters y Bennett, 2004).

Sin embargo en el sistema trigeminal, los modelos animales están más limitados y únicamente la CCI-IoN ha ganado suficiente aceptación como un modelo de roedor para el estudio de la neuralgia del trigémino (Vos et al., 1994). El comportamiento nociceptivo que sigue la CCI-IoN se caracteriza por una alodinia mecánica e hiperalgesia térmica que precede a una fase transitoria de disminución de la respuesta a estímulos mecánicos y térmicos.

Los modelos animales de dolor neuropático en algunos casos son inconsistentes con el dolor experimentado en humanos. La alodinia en la polineuropatía diabética dolorosa en humanos es infrecuente mientras que parece ser constante en los modelos en roedores. A

esto hay que añadir las dificultades para estudiar el comportamiento y cuantificar el dolor experimentado en los animales. Uno de los más utilizados es el método del umbral de retirada en el que se van aplicando estímulos cada vez mayores sobre la región del animal que se quiere estudiar y se objetiva un valor para el cual se produce la retirada.

Una de las preguntas sobre los modelos animales de dolor neuropático es si estos modelos realmente predicen y se superponen a los resultados de los ensayos clínicos en humanos. Los resultados de los diferentes métodos que se han llevado a cabo para el desarrollo de modelos animales se han estudiado mediante un metaanálisis desarrollado por Kontinen y Meert (Kontinen y Meert, 2003) que evaluaron los resultados de 119 estudios sobre la eficacia de los modelos animales de dolor neuropático. Sus estudios sugirieron que el desarrollo de dolor se producía en el 88% de los casos en el modelo de CCI, comparada con el 68% del ligamiento de los nervios espinales, el 61% del ligamiento parcial del nervio ciático y el 70% del modelo de polineuropatía diabética con estreptozotocina. Estos resultados son muy superiores a la prevalencia del dolor que se produce en las enfermedades neurológicas.

1.3.1 Elección de los animales y las especies

En la mayoría de los casos, las ratas y los ratones son las especies experimentales de elección para los modelos de dolor neuropático. Sin embargo, queda en duda si estas especies ofrecen modelos razonables y útiles para estudiar la conducta en enfermedades humanas complejas. Además, los roedores utilizados en los modelos de dolor neuropático son previamente sanos, jóvenes y machos genéticamente similares (Mogil y Chanda, 2005). En los humanos, el dolor neuropático se presenta en el contexto de enfermedades crónicas o en la ancianidad (Pickering et al., 2006). La edad y la raza de los roedores tienen un importante impacto en el desarrollo de los signos tras la lesión nerviosa y los tratamientos analgésicos aplicados por lo general se estudian durante un corto espacio de tiempo en relación a los tratamientos crónicos que se emplean durante años en los seres humanos.

Por otro lado, los estudios que se realizan en roedores no son éticamente justificables o científicamente factibles en voluntarios humanos o en pacientes. Además, los costes económicos disuaden la utilización de otros modelos superiores como los primates, mucho más apropiados para el estudio de la conducta humana. Estas limitaciones explican por qué los roedores son los animales que más utilizan hoy día para el estudio del dolor.

1.3.2 Patrón temporal y cronicidad de los modelos animales

Existen importantes diferencias entre la duración de la enfermedad entre los modelos en roedores y las enfermedades humanas. Por ejemplo, la duración media de la enfermedad en pacientes que sufren una neuralgia postherpética es de cuatro años (Rice et al., 2001) y la neuralgia del trigémino puede ser una enfermedad crónica que acompañe durante toda la vida al paciente, mientras que los modelos animales en roedores de neuralgia postherpética, el dolor se mantiene durante unas 10 semanas (Garry et al., 2005), y los modelos de neuralgia del trigémino por CCI-IoN suelen provocar dolor que comienza a remitir a partir de las pocas semanas.

Los tratamientos aplicados sobre estos modelos animales se suelen realizar entre dos y cuatro semanas tras la lesión nerviosa (Hasnie et al., 2007) y por un breve espacio de tiempo, mientras que estos mismos tratamientos suelen ser crónicos en humanos por lo que los mecanismos de acción pueden ser muy diferentes y muy difíciles de comparar entre ambas especies.

1.3.3 Incidencia del dolor

La mayoría de los sujetos que experimentan una enfermedad (lesión de nervios periféricos, diabetes mellitus, esclerosis múltiple...) capaz de desarrollar dolor neuropático, no lo desarrollan. Por ejemplo, la incidencia del dolor neuropático en la diabetes mellitus es de alrededor del 30%, de la neuralgia herpética del 9% (Scott et al., 2003) y de la esclerosis múltiple de alrededor la mitad de los casos (Bermejo et al., 2010). En contraposición a esto, los modelos animales de dolor neuropático presentan una alta frecuencia de animales respondedores que no necesariamente representan la situación clínica que intentan imitar.

1.3.4 Cuantificación de resultados

Al igual que en los puntos anteriores, existen claras diferencias entre la medición del dolor en pacientes y en modelos animales. Por un lado, las primeras variables medibles en los ensayos clínicos son siempre algunos aspectos de la sintomatología del dolor, mientras que las respuestas de retirada a una gama de estímulos sensitivos es la medida más frecuentemente utilizada en modelos animales. Esta respuesta de retirada refleja un aspecto de la alteración sensitiva que sufre el animal, entendida como alodinia o hiperalgesia, que es un signo observado sólo en una pequeña proporción de sujetos que

sufren dolor neuropático (Backonja et al., 2004). A diferencia de lo que ocurre en los modelos animales, los ensayos clínicos en humanos miden otras variables como el dolor espontáneo continuo o paroxístico, la calidad de vida, la discapacidad física y las alteraciones emocionales (Doth et al., 2010), que no se exploran en los modelos animales. La tabla 1 muestra las diferencias existentes entre las variables estudiadas en ensayos clínicos en humanos y en los modelos animales de dolor neuropático. Sin embargo, existen diversas publicaciones que pretenden estudiar una amplia gama de comportamientos animales en modelos de dolor neuropático que se han relacionado con la impresión global o con el dolor espontáneo (King et al., 2009), los comportamientos similares a la ansiedad que también podrían traducir dolor espontáneo (Wallace et al., 2008), las alteraciones del ritmo circadiano (Monassi et al., 2003), la depresión (Hu et al., 2009) y los cambios de peso (Imamura et al., 1997). Estos comportamientos por lo general son más fáciles de estudiar en las ratas que en los ratones (Cryan y Homes, 2005) aunque un estudio reciente describe un método para medir el dolor en ratones utilizando un análisis de la expresión facial (Langford et al., 2010).

Variable estudiada	Modelos animales	Ensayos clínicos (humanos)
Hipersensibilidad cutánea	+	+/-
Dolor espontáneo continuo	-	++
Dolor espontáneo paroxístico	-	+/-
Comorbilidades	-	+
Calidad de vida	-	+
Impresión clínica global	-	+
Discapacidad física	-	+
Alteraciones emocionales	-	+

Tabla 1. Comparación entre las variables estudiadas en los modelos animales y en los ensayos clínicos en humanos para el estudio del dolor neuropático.

El estudio de la conducta de los animales exige unas condiciones uniformes para su evaluación. Esto incluye que todos los animales reciban unas condiciones similares de habitabilidad y de manipulación previas a la evaluación de la respuesta algésica (Chesler et al., 2002).

1.3.5 Modelo de constricción crónica del nervio infraorbitario (CCI-IoN)

Varios estudios clínicos han sugerido que los síndromes de dolor crónico se producen con más frecuencia en el sistema trigeminal que en los niveles espinales (Sweet, 1984). Además los síndromes algésicos en la región trigeminal se pueden presentar con un espectro clínico de síntomas muy diversos (Fields, 1996). La neuralgia del trigémino idiopática o primaria se suele presentar como descargas dolorosas en la distribución del nervio del trigémino, similares a las experimentadas al sufrir un shock eléctrico, si bien en algunos casos se describe únicamente como sensación quemante o parestesias en el territorio trigeminal. Los paroxismos de dolor pueden aparecer de forma espontánea pero son generalmente desencadenados con estímulos mecánicos aunque estos sean de escasa intensidad. Una de las diferencias fundamentales de la neuralgia del trigémino secundaria es que el dolor se sigue únicamente tras la estimulación de la región dolorosa (Loeser, 1994).

El IoN en roedores adquiere un importante tamaño comparado con el resto de nervios periféricos del animal ya que es el encargado de transmitir la información procedente de las vibrisas mistaciales, la piel que las rodea, parte de la nariz, la arcada dentaria superior y parte de la región dorsal de la cavidad oral (Fink et al., 1975). De hecho, constituye casi la totalidad de la división maxilar del nervio trigémino (Greene, 1955). Morfológicamente el IoN consiste en 18-25 fascículos que contienen unas 20.000 fibras mielínicas y unas 13.000 amielínicas distribuidas a lo largo del nervio y que adquieren en su conjunto un gran tamaño (Jacquin et al., 1984). Este hecho permite que pueda ser manipulado quirúrgicamente de forma fácil y reproducible por lo que, mediante su constricción, se ha desarrollado un modelo de dolor neuropático en roedores que recuerda a la neuralgia del trigémino en humanos (Vos et al., 1994).

Tras la CCI-IoN, las ratas presentan cambios tanto en las respuestas evocadas como en su comportamiento espontáneo. Estos cambios de conducta se desarrollan en dos fases. Por un lado, en la etapa temprana (días 1-15 tras la cirugía), las ratas muestran un aumento de las muecas faciales y de la estimulación de la región inervada por el IoN (Vos et al., 1998), mientras que la respuesta a la estimulación de esta área está disminuida.

Posteriormente (a partir del día 15 tras la cirugía), la asimetría de las muecas faciales se reduce progresivamente aunque persiste aumentada respecto al lado control. La hiporreactividad inicial se sustituye de un modo brusco (alrededor del día 15) por una hiperreactividad que cursa clínicamente con hiperalgesia y alodinia y recuerda a la neuralgia del trigémino en humanos.

1.3.6 Evaluación de fármacos frente al dolor neuropático mediante modelos animales

Existen diversos tratamientos empleados para el tratamiento del dolor neuropático, siendo la mayoría de ellos fármacos utilizados también como antiepilépticos y que en la actualidad han recibido el nombre de neuromoduladores dado que son capaces de actuar sobre otras enfermedades como la migraña o el dolor neuropático (Bermejo y Velasco, 2007; Bermejo y Anciones, 2009). La gabapentina (GBP) es un fármaco anticomitial ampliamente utilizado en el tratamiento del dolor neuropático que se ha utilizado para este propósito desde mediados de los años noventa (Rosner et al., 1996) y que también ha demostrado disminuir el dolor neuropático en diversos modelos animales (De la O-Arciniega et al., 2009). El papel de los modelos animales para estudiar la eficacia de ciertos fármacos en el tratamiento del dolor neuropático no es exclusivo de la GBP sino que han resultado útiles para determinar la eficacia antialgésica de muy diversos fármacos, ya sean antiepilépticos (Park et al., 2010) o no (Nakai et al., 2010; Hu et al., 2010).

1.4 CAMBIOS EN EL SISTEMA TRIGEMINAL ASOCIADOS AL DOLOR NEUROPÁTICO

1.4.1 Dolor neuropático y sistema nervioso periférico

El dolor puede tener diversos orígenes: el dolor *nociceptivo*, causado por la estimulación de nociceptores que inervan la piel, las vísceras, las articulaciones y otros órganos, el dolor *neuropático*, producido por una disfunción o lesión del sistema nervioso, el dolor *psicógeno*, de origen no orgánico, que surge como consecuencia de enfermedades de origen psíquico y el dolor *de causa indeterminada* (Mogil, 2010). Sin embargo, en base a los últimos avances se ha propuesto una nueva clasificación de los diferentes tipos de dolor. En ella, el dolor *neuropático* se debe a una respuesta inapropiada del sistema

somatosensorial a una lesión o enfermedad que produce un procesamiento anormal de la información nociceptiva y que se percibe como dolor en ausencia de estímulos y respuestas aumentadas ante estímulos inocuos o dolorosos. El dolor *nociceptivo* sería debido a una respuesta fisiológica producida por estímulos nocivos que superan el umbral de los nociceptores. Esta nueva clasificación también incluye el dolor *inflamatorio*, debido a una hipersensibilidad por una inflamación de los tejidos periféricos y la sensibilización del sistema nociceptivo, y el dolor *disfuncional*, debido a una amplificación de la señal algésica en ausencia de inflamación o lesiones del sistema somatosensorial (Costigan et al., 2009).

El dolor neuropático puede tener un origen periférico o central. El periférico se produce por una lesión o disfunción de las neuronas aferentes primarias, que en el caso del dolor trigeminal se puede situar en cualquiera de las ramas trigeminales, el ganglio de Gasser o la raíz del trigémino. Las lesiones capaces de producir este tipo de dolor puede ser de origen compresivo, traumático, inflamatorio, isquémico, tóxico, infeccioso, metabólico, degenerativo o tumoral (Baron et al., 2010). El dolor neuropático no es producido por un único mecanismo fisiopatológico, sino que los mecanismos que pueden contribuir a la aparición de síntomas son múltiples y pueden involucrar tanto al sistema nervioso central como al periférico. Los mecanismos periféricos más frecuentes relacionados con el desarrollo del dolor neuropático son la generación de impulsos ectópicos, las transmisiones efápticas, la sensibilización de los nociceptores, las alteraciones del sistema nervioso simpático y una diversidad de fenómenos inflamatorios e inmunológicos que implican células no neurales en los troncos nerviosos (Castro-Lopes, 2007; Benarroch, 2010).

Las lesiones nerviosas, como la constricción del IoN, pueden provocar una desdiferenciación de las células de Schwann que controlan el desarrollo y la migración del axón y producir en ellas un cambio funcional desde la formación de mielina normal hasta la síntesis desregulada de factores neurotróficos. Este nuevo ambiente alrededor del axón dañado puede afectar tanto a las neuronas dañadas como a las sanas, lo que produce una serie de cambios en los axones y somas neuronales afectados que contribuye en última instancia al desarrollo del dolor neuropático (Woolf y Salter, 2000). Uno de los factores neurotróficos liberados es el NGF (*nerve growth factor*), que es captado por el extremo lesionado de las neuronas dañadas y transportado retrógradamente hacia el soma neuronal, donde altera la expresión de genes que son cruciales para la transmisión de la información sensorial. Estos genes incluyen neurotransmisores, receptores y canales iónicos. De hecho, la administración de NGF ha demostrado producir estados algésicos

tanto en roedores como en humanos (Petty et al., 1994). Existe evidencia además, de que parte de los efectos mediados por el NGF son indirectos a través de los mastocitos, los macrófagos, las neuronas eferentes simpáticas y los neutrófilos (Costigan et al., 2009). Además el NGF puede dar lugar a un aumento de BDNF (*brain-derived neurotrophic factor*), también relacionado con el desarrollo de un estado pronociceptivo (Kerr et al., 1999). Estos cambios dan lugar a un incremento de excitabilidad en las neuronas sensitivas que puede tener consecuencias funcionales dramáticas y puede contribuir directamente a estados de hiperalgesia a través de una disminución del umbral para el que los estímulos táctiles se perciben como dolorosos.

Además de factores neurotróficos se han involucrado una variedad de citokinas y quimiokinas como el TNF α (*tumor necrosis factor*), la IL-1 (*interleucina 1*) y la IL-6 (*interleucina 6*) que dan lugar a una cascada de señales intracelulares (Dai et al., 2002) y pueden provocar un cambio en la expresión génica de las neuronas del asta posterior de la médula y del complejo trigeminal y producir un estado pronociceptivo (Uceyler y Sommer, 2008). Los receptores del ácido lisofosfatídico, los receptores purinérgicos, la IL-1, el BDNF y un gran número de citokinas (Lisak et al., 1997) se han relacionado con el desarrollo de dolor neuropático, mientras que canal de sodio Na_v1.9 y la óxido nítrico sintasa neuronal entre otros se han relacionado con el dolor nociceptivo (Zhang y Bao, 2006).

1.4.2 Cambios producidos en el sistema nervioso central. Sensibilización central

La sensibilización central depende fundamentalmente de la activación de los receptores glutamatérgicos de tipo NMDA (*N-metil-D-aspartato*) y del consecuente aumento de la concentración intracelular de calcio y activación de proteincinasas (PKs). Cuando se activa una fibra C por un estímulo nociceptivo se libera glutamato en la sinapsis entre su terminación central y la neurona del complejo trigeminal. El glutamato se une a los receptores NMDA y AMPA (*ácido α -amino-3-hidroxi-5-metil-4-isoxazolpropiónico*) provocando una despolarización de la membrana de la neurona trigeminal y a la posible generación de un potencial de acción. Esta despolarización transitoria provoca la apertura de canales de calcio dependientes de voltaje, lo que hace que la membrana neuronal quede despolarizada por el aumento de la concentración intracelular de sodio y de calcio y favorece los cambios posteriores que pueden dar lugar al desarrollo de dolor neuropático.

La sustancia P, que se libera junto al glutamato también tiene un papel fundamental en la activación de los receptores NMDA y a sus principales receptores denominados NK1 (*neurokinina 1*) se les ha relacionado con el origen del dolor neuropático central (Bereiter et al., 1998; Miaucourt et al., 2009). Su activación conduce a la activación de la fosfolipasa C y a la producción de trifosfato de inositol y diacilglicerol que provocan la fosforilación de los receptores NMDA y los hacen resistentes al bloqueo por magnesio, contribuyendo al desarrollo de un estado pronociceptivo crónico. Estos receptores se han descrito en un elevado número en el complejo trigeminal (Park et al., 2010c).

El aumento de la concentración intracelular de calcio es crucial en el desarrollo de la hiperexcitabilidad neuronal. La principal competencia de este aumento de calcio es la activación de diversas enzimas, entre ellas algunas PKs, cuya función es la fosforilación de determinadas proteínas las cuales dan lugar a un estado pronociceptivo. La PKC (proteincinasa C) produce una fosforilación de los receptores NMDA, inhibiendo su bloqueo por el magnesio, fosforila los canales de potasio dependientes de voltaje, facilita la translocación a la membrana de los receptores AMPA intracelulares almacenados (Velázquez et al., 2007). Por otro lado, la PKG (proteincinasa G) contribuye a la sensibilización central a través de la fosforilación e inhibición de los receptores inhibidores GABA_A (Sung y Ambron, 2004) mientras que la PKA (proteincinasa A) también provoca desinhibición de los receptores GABA_A (Sigel, 1995).

El estado pronociceptivo producido por la elevación de calcio intracelular puede incluso producir la activación de algunos genes, a través de varias vías de señalización intracelular. Este es el caso del c-fos, muy utilizado como marcador de la activación de las neuronas de la médula espinal por los estímulos nociceptivos (Hossaini et al., 2010)

Aunque la mayoría de los estudios sobre la sensibilización central se han realizado sobre el complejo trigeminal, también se han demostrado fenómenos de sensibilización en estructuras supraespinales como el tálamo o la corteza, lo que se ha relacionado con un aumento de los campos receptores y en los que también parecen tener un papel importante los receptores NMDA y el aumento intracelular de calcio (Burstein et al., 2010). La lesión de los nervios periféricos en ratas (Waite, 1984; Jacquin 1989) y gatos (Kalaska y Pomeranz, 1982) puede producir cambios importantes en la somatotopía central y en las propiedades de los campos receptivos las neuronas de segundo orden del complejo trigeminal del tronco, de manera que cada célula individual tiene campos receptivos anormalmente extensos y en ocasiones discontinuos, observándose un aumento de la representación central de las proyecciones periféricas adyacente al sitio de denervación en el tálamo y en la CxSS (Rhoades et al., 1987).

El número de receptores involucrados en el estado pronociceptivo cada vez es mayor y se están produciendo importantes avances en los últimos años. Se ha comprobado que se produce un aumento de expresión de los receptores purinérgicos P2X en la médula espinal cervical, el ganglio del trigémino y el IoN en modelos animales con constricción del IoN (Nakai et al., 2010) y se ha sugerido un papel de estos receptores en la iniciación y el mantenimiento de la sensibilización central (Hu et al., 2002). También se ha comprobado una disminución de la actividad del receptor cannabinoide 1 en la corteza cingulada anterior en ratones a los que se la sometido a una CCI (Hoot et al., 2010) y una implicación de los receptores serotoninérgicos (Okamoto et al., 2007) y los adrenérgicos alfa y beta (Han et al., 2006) en el mantenimiento del estado pronociceptivo. Se ha identificado una subpoblación de neuronas en la sustancia gelatinosa del Vc que expresan receptores vaniloides TRPV1 (*transient receptor potential cation channel, subfamily V, member 1*), los cuales se activan directamente mediante algunas sustancias nociceptivas como la capsaicina y que también parecen tener también un papel en el desarrollo del dolor neuropático (Han et al., 2009).

En los últimos años se ha observado una activación de las células gliales en varios modelos experimentales de dolor neuropático e inflamatorio mientras que se ha demostrado que los inhibidores de la activación glial reducen la hiperalgesia y la alodinia en estos modelos animales. Algunas sustancias liberadas por los aferentes primarios como la sustancia P, el ATP y la fractalcina podrían activar la glía, lo que daría lugar a la síntesis y liberación de sustancias que actúan sobre las neuronas trigeminales y sobre las terminaciones de los aferentes primarios (Benarroch, 2010).

1.4.3 Reducción de la modulación inhibitoria. Papel de las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas en el dolor neuropático

La actividad de las neuronas nociceptoras del complejo trigeminal depende del equilibrio entre el flujo excitador procedentes de los nociceptores y la acción inhibitoria procedente de las interneuronas inhibitorias gabaérgicas y glicinérgicas y de las fibras que proceden de niveles supraespinales.

Como se describió anteriormente, las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas están presentes en diversas localizaciones del asta posterior de la médula y del complejo trigeminal y éstas se encuentran implicadas en la transmisión nociceptiva. GABA y glicina abren canales iónicos que permiten el paso del cloro y en menor medida de bicarbonato a través de la membrana plasmática. En la mayoría de los casos, esta acción

inhibe la activación neuronal a través de una hiperpolarización de la membrana celular (Zeilhofer, 2005).

Las neuronas gabaérgicas se caracterizan por la existencia de una enzima que sintetiza GABA a partir del glutamato denominada GAD (*glutamato aminodecarboxilasa*) de la que existen las isoformas GAD65 y GAD67 (Mackie et al., 2003). El descenso de inmunorreactividad para GAD65 en el Vc en un modelo de dolor neuropático por CCI-IoN (Martin et al., 2010) ha sugerido que la desinhibición de las interneuronas secundario al descenso de la actividad de GAD65 juega un papel importante en el desarrollo de la alodinia tras la CCI. En esta misma línea, otros estudios también han demostrado que la transmisión gabaérgica está implicada en el desarrollo de dolor neuropático. Ejemplos son el de Hasbargen et al (2010) o los de Daemen y Gosselin (Daemen et al., 2008; Gosselin et al., 2010) que sugieren que la modificación de la actividad gabaérgica secundaria a una alteración en el equilibrio del transporte del cloro o al aumento del transportador gabaérgico GAT-1 (*GABA transporter 1*) se relacionan con el desarrollo de un estado pronociceptivo. Por otro lado, la activación de la enzima GAD65 y el consiguiente aumento de GABA disminuye el dolor neuropático en modelos animales (Kim et al., 2009).

Existen dos tipos de receptores GABA: los *ionotrópicos* (GABA_A) y los *metabotrópicos* (GABA_B y GABA_C). Los receptores GABA_A se sitúan en la membrana plasmática del terminal postsináptico y está relacionado con los receptores benzodiazepínicos. Abren canales de cloro y son inhibidores. Por su parte, los receptores GABA_B y GABA_C se encuentran en los terminales pre y postsinápticos y no tienen relación con los receptores de las benzodiazepinas. Los receptores GABA_B aumentan la permeabilidad al potasio y también son inhibidores. El receptor GABA_A parece tener un importante papel en el desarrollo de dolor neuropático, y se ha comprobado que el uso de agonistas frente a este receptor parece disminuir la intensidad del dolor y el uso de antagonistas parece aumentarlo (Naik et al., 2008). Por su parte, los receptores GABA_B tienen un papel menos claro aunque también se han relacionado con el desarrollo de un estado pronociceptivo (Ouyang et al., 2007).

Curiosamente, en los casos de dolor crónico inflamatorio, se ha descrito un aumento de los niveles de GABA y de GAD, contrariamente a lo que sucede en los casos de dolor neuropático, lo que sugiere que en este caso, la acción del GABA podría oponerse a la aparición de la sensibilización central.

En los últimos años se ha obtenido mucha información acerca de estos receptores gabaérgicos dado su potencial papel como diana terapéutica en diversas condiciones

algésicas. Se ha descrito una importante presencia de neuronas gabaérgicas (Ginestal y Matute, 1993; Polgár y Antal, 1995; Wang et al., 2000; Avendaño et al., 2005) y de receptores GABA_A distribuidos a lo largo del complejo trigeminal y se ha comprobado que la sección de nervios periféricos provoca una disminución del número de neuronas gabaérgicas y de las concentraciones de GABA en el asta dorsal de la médula espinal, así como una reducción de los receptores GABA_B (Chen et al., 2009). Además se ha sugerido que los receptores espinales GABA_A y GABA_B median el efecto supresor de la electroacupuntura en la alodinia en modelos animales de dolor neuropático en ratas (Park et al., 2010) y se ha comprobado que la pérdida de interneuronas gabaérgicas contribuye a disminuir el tono gabaérgico y a favorecer el desarrollo de dolor neuropático en las lesiones medulares en rata (Meisner et al., 2010), lo cual se ha conseguido revertir mediante el trasplante de células gabaérgicas (Kim et al., 2010).

Al igual de lo que sucede con la neurotransmisión gabaérgica, la glicinérgica también se ha relacionado con una inhibición de los impulsos nociceptivos hacia niveles superiores y se cree que su desequilibrio también desempeña un importante papel en el desarrollo de modelos de dolor neuropático. Una pérdida de la inhibición glicinérgica sináptica se ha reconocido como un proceso importante en el desarrollo y mantenimiento del dolor crónico inflamatorio y neuropático (Zeilhofer, 2008).

Las neuronas glicinérgicas se han encontrado ampliamente distribuidas en el asta posterior de la médula espinal (Pfeiffer et al., 1984) y en el complejo trigeminal (Rampon et al., 1996) y se caracterizan por la presencia del receptor de glicina GlyT2 (*glycine transporter 2*) y por la inmunorreactividad de los somas neuronales frente a glicina. En el asta posterior de la médula, las neuronas glicinérgicas se encuentran en las láminas profundas (III-V) y en la lámina I, mientras que apenas existen en la lámina II. Por otro lado, se ha descrito la existencia de neuronas glicinérgicas en diferentes regiones del tronco del encéfalo además del Vc, como el complejo Böttinger, relacionado con la respiración, el núcleo retroambiguo, la región inmediatamente dorsal al núcleo olivar inferior y la zona límite entre el núcleo hipogloso y la formación reticular (Schreihofer et al., 1999; Tanaka et al., 2003).

La mayoría de los estudios realizados en médula espinal han encontrado una intensa colocalización entre las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas. Estas neuronas reciben una importante cantidad de proyecciones de mecanorreceptores, lo que sugiere que juegan un papel importante en el procesamiento de la sensibilidad táctil. Se ha sugerido que la inhibición de la transmisión glicinérgica de estas sinapsis daría lugar a una sensación dolorosa ante los estímulos táctiles, lo que explicaría el fenómeno de alodinia y que

ocurre frecuentemente en pacientes con dolor neuropático. En consonancia con esto, el bloqueo de los receptores gabaérgicos y glicinérgicos en el asta dorsal de la médula se ha relacionado con un aumento de las respuestas nociceptivas (Sorkin et al., 1998; Cronin et al., 2004). Por todo ello, se ha sugerido que la sensibilización al dolor se produce por un descenso del control inhibitorio del dolor a través de la glicina y el GABA.

1.5 MÉTODOS DE CUANTIFICACIÓN

Uno de los principales problemas a los que se ha enfrentado la histología y la neurociencia es la cuantificación de las estructuras. A lo largo de la historia se han empleado muchos métodos lo que ha propiciado que no se disponga de datos homogéneos de estructuras sencillas como los núcleos del complejo trigeminal y que los estudios anatómicos estén claramente retrasados frente a otros. En general se pretende un método eficaz y eficiente, es decir, que permita la obtención de datos reales y que el esfuerzo empleado en ello sea factible.

El método más directo y más antiguo de cuantificación sería el recuento de los perfiles celulares, el cual puede parecer simple en un primer momento, pero que entraña una gran complejidad y frecuentes errores. Ello es debido a que el primer paso para la cuantificación de estructuras tisulares consiste en procesar el tejido y utilizar secciones histológicas del mismo que posteriormente llevarán una preparación determinada con las necesarias tinciones. Si contamos únicamente los perfiles de estas secciones produciríamos numerosos errores en la cuantificación ya que por un lado identificaríamos estructuras en más de una sección, produciendo una doble cuantificación de las mismas (estructura cortada, presente en dos secciones y contada en las dos), además de otros producidos por la óptica como la sobreproyección o por el hecho de realizar las secciones con la correspondiente pérdida de fragmentos nucleares y celulares.

Otro método más exacto pero menos eficiente consistiría en la reconstrucción seriada de los objetos. Según esta técnica se examinarían secuencialmente las diferentes secciones del tejido y se determinarían los perfiles en todas las secciones para evitar la cuantificación de dos veces de la misma estructura. Este método se basa en la continuidad física de los perfiles y cada estructura es reducida a un punto, es decir a un parámetro de dimensión cero con lo que se evita la doble cuantificación. Este método aunque es más exacto que el anterior exige un enorme esfuerzo por parte del investigador para llevar a cabo el contaje.

Por otro lado, debido al enorme número de elementos que habitualmente forman las estructuras que pretendemos cuantificar en neurociencia, suele ser necesario reducir el tejido estudiado a una muestra representativa del mismo y obtener una estimación del número final que pretendemos obtener. Para obtener la muestra representativa deben seguirse una serie de normas para no producir sesgos en la cuantificación. En primer lugar, es preciso asegurarse de que todas las partículas que se van a cuantificar tienen la misma probabilidad de ser contadas, lo cual es importante si se tiene en cuenta que las partículas no están distribuidas de un modo uniforme dentro del sistema nervioso central.

Tras un correcto muestreo se debe proceder a la cuantificación, evitando en lo posible los sesgos que de ella se pueden producir. Históricamente se han utilizado métodos que relacionaban el número de perfiles que se observaban del objeto que se pretendía cuantificar en una sección y el número de objetos dentro de las estructuras que se estaba analizando. De este modo, se asumían determinadas relaciones entre los perfiles de las estructuras que se analizaban y el tamaño, la forma y la distribución espacial de las partículas que se pretendían cuantificar. El método más conocido que ha seguido este principio es el de Abercrombie (Abercrombie, 1946) y las modificaciones introducidas por otros autores (Königsmark, 1970) que incorpora varias correcciones para evitar los sesgos derivados de la pérdida de fragmentos y la sobreprotección. Estos métodos introducen frecuentemente errores sistemáticos en la cuantificación, ya que asumen características en relación al tamaño y a la forma de las partículas estudiadas y además introducen complejidad a los métodos de cuantificación.

En un intento de evitar los sesgos derivados de los métodos de cuantificación, ha surgido una nueva metodología de cuantificación aplicable a la histología en general y a la neurociencia en particular denominada estereología (Gundersen et al., 1988). Esta nueva disciplina comprende un conjunto de métodos morfométricos para la exploración tridimensional del espacio y permite obtener datos cuantitativos no sesgados a partir de elementos en dos dimensiones, para lo que utiliza propiedades geométricas intrínsecas a las estructuras que son objeto de estudio. Es decir, se trata de una extrapolación del plano al espacio. El objetivo de la estereología es la obtención de las propiedades cuantitativas de las partículas geométricas a partir de secciones o proyecciones de las mismas y no se persigue el estudio de las propiedades cualitativas de los objetos geométricos. Concretamente no se pretende reconstruir un objeto a partir de sus secciones o proyecciones. La estereología aporta además un método de muestreo no sesgado y no introduce errores sistemáticos en la cuantificación ya que permite que todas las partículas

tengan la misma probabilidad de ser cuantificadas y las herramientas de contaje son independientes de las características geométricas de los objetos.

En cuanto a la fundamentación matemática de la estereología, ésta es, al igual que sus aplicaciones muy diversa e incluye básicamente herramientas de geometría diferencial e integral, probabilidad geométrica y teoría de muestreo espacial. De las distintas herramientas utilizadas por la estereología, destacamos el estimador de Cavalieri que permite la medición del volumen de estructuras y el fraccionador y el disector óptico y físico permiten la cuantificación del número de neuronas en un corte histológico. Estas técnicas van a ser usadas en este proyecto de investigación y serán ampliadas en la sección *Material y Métodos*.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Se pretende obtener datos cuantitativos fiables, con una precisión conocida sobre los núcleos del trigémino y la corteza cerebral y las modificaciones que se producen en ellos en modelos de dolor neuropático y tras tratamiento con GBP. En particular se estimará el número de neuronas de proyección y de interneuronas inhibitorias gabaérgicas y glicinérgicas en el núcleo del trigémino en condiciones normales y de cómo se modifican estas neuronas inhibitorias en modelos de dolor neuropático según el modelo de CCI, tras la administración de GBP y en los modelos CCI a los que se ha administrado GBP.

2.2 OBJETIVOS CONCRETOS

Los objetivos concretos se agrupan en tres apartados, surgidos del desarrollo de la Tesis. A) El primer apartado consiste en la determinación del número absoluto y relativo de neuronas de los núcleos del trigémino que proyectan al tálamo y al cerebelo. De este modo se obtiene una aproximación estereológica del transporte ascendente de la información desde los núcleos del trigémino hasta niveles superiores de información. B) El segundo apartado corresponde al estudio de los mecanismos de inhibición local del trigémino en el que se caracterizan las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas de estos núcleos. C) En tercer lugar, se pretende estudiar la modificación de la inhibición nociceptora trigeminal en modelos de dolor neuropático CCI, tras la administración de GBP y en modelos CCI a los que se ha administrado GBP. D) En cuarto lugar se pretende estudiar la presencia de neuronas gabaérgicas en el área de barriles de la CxSS de rata y su modificación en modelos animales de dolor neuropático por CCI, administración de GBP y modelo CCI con administración de GBP.

A) Estudio morfométrico de los núcleos del trigémino de la rata atendiendo al volumen y número de neuronas totales y de proyección de los distintos subnúcleos. Para ello se realizaron estimaciones de:

- A.1) Número total de neuronas de los núcleos del trigémino.
- A.2) Número de neuronas que proyectan al tálamo.
- A.3) Número de neuronas que proyectan al cerebelo.
- A.4) Volumen de los distintos núcleos del trigémino.

B) Estudio de los mecanismos de inhibición local del trigémino, consistente en la cuantificación de las neuronas inhibitorias gabaérgicas y glicinérgicas y su distribución en los diferentes núcleos del trigémino. Se realizaron las siguientes estimaciones:

B.1) Cuantificación de las neuronas gabaérgicas en los núcleos caudal, interpolar y principal del trigémino.

B.2) Cuantificación de las neuronas glicinérgicas en los núcleos caudal, interpolar y principal del trigémino.

B.3) Cuantificar la posible colocalización de estos dos neurotransmisores en las neuronas de los diferentes núcleos del trigémino.

B.4) Determinar la existencia o no de neuronas de proyección que expresen GABA y/o glicina.

C) Estudiar la modificación de las neuronas inhibitorias trigeminales ante diferentes situaciones. Las estimaciones realizadas fueron las siguientes:

C.1) Cuantificación de las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas de los diferentes núcleos del trigémino en modelos animales de dolor neuropático por CCI.

C.2) Cuantificación de las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas en animales a los que se les ha administrado GBP.

C.3) Cuantificación de las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas en modelos animales de dolor neuropático por CCI a los que se les ha administrado GBP.

D) Estudio de la inhibición nociceptora del área de barriles de la corteza somestésica mediante la cuantificación de las neuronas gabaérgicas y su cuantificación en animales controles, en modelos animales de dolor neuropático y tras la administración de GBP. Para ello, se realizaron las siguientes estimaciones:

D.1) Cuantificación de las neuronas gabaérgicas en el área de barriles de la corteza cerebral en animales controles.

D.2) Cuantificación de las neuronas gabaérgicas en el área de barriles de la corteza cerebral en modelos animales de dolor neuropático por CCI.

D.3) Cuantificación de las neuronas gabaérgicas en el área de barriles de la corteza cerebral en animales tras la administración de GBP.

D.4) Cuantificación de las neuronas gabaérgicas en el área de barriles de la corteza cerebral en modelos animales de dolor neuropático por CCI tras la administración de GBP.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

3.1 ANIMALES DE EXPERIMENTACIÓN Y GRUPOS

Este estudio ha sido realizado de acuerdo con la normativa referida para animales de experimentación (RD 1201/2005) y todos los procedimientos realizados con animales se rigen por lo establecido en el Real Decreto 223/1988 en lo referente a la protección de los animales utilizados en la experimentación y otros propósitos científicos, y están supervisados por la Directora del Gabinete Veterinario de nuestra Facultad.

Los experimentos se llevaron a cabo con un total de 52 ratas macho adultas con un peso entre 250 y 300 gramos de la especie Sprague-Dawley (Harlan Ibérica. Barcelona) que se distribuyeron en cinco grandes grupos dependiendo del protocolo empleado en cada uno de ellos. Entre paréntesis se indica el número de animales que resultaron útiles para cada uno de los protocolos.

Grupo A (n=12). Estudio morfométrico y de proyecciones. Animales en los que se inyecta HRP en el tálamo o en el cerebelo y se estudia la proyección a estas estructuras desde el complejo trigeminal.

Grupo B₁ (n=6). Cuantificación de las neuronas inhibitorias de GABA y glicina.

Grupo control. Animales en los que se cuantifican las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas en condiciones de control.

Grupo B₂ (n=4). Cuantificación de las neuronas inhibitorias de GABA y glicina.

Grupo tratado con CCI-IoN. Animales en los que se cuantifican las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas tras la realización de una CCI-IoN.

Grupo B₃ (n=6). Cuantificación de las neuronas inhibitorias de GABA y glicina.

Grupo tratado con GBP. Animales en los que se cuantifican las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas tras la administración de GBP.

Grupo B₄ (n=3). Cuantificación de las neuronas inhibitorias de GABA y glicina.

Grupo tratado con CCI-IoN y con GBP. Animales en los que se cuantifican las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas tras la realización de una CCI-IoN y tras administración de GBP.

Grupo C (n=2). Análisis de neuronas de proyección que expresen GABA y/o glicina.

Animales en los que se inyecta HRP en el tálamo y analiza la existencia de neuronas que proyecten al tálamo y que a su vez expresen GABA y/o glicina.

Los 19 animales restantes fueron utilizados para la optimización del modelo de dolor neuropático y de la inmunohistoquímica para GABA y glicina. En ellos se probaron las diferentes técnicas quirúrgicas: realización de una sola ligadura de catgut en la región

proximal del IoN (3 animales), dos ligaduras de catgut en las regiones proximal y distal del IoN (2 animales), realización de dos ligaduras, una de catgut y otra de seda trenzada en las regiones proximal y distal del IoN (3 animales), dos ligaduras de seda trenzada en las regiones proximal y distal del IoN (3 animales), dos ligaduras de catgut y dos de seda trenzada en las regiones proximal y distal (2 animales) y dos ligaduras de catgut y dos de polipropileno (Prolene®). Dado que estos modelos de CCI-IoN obtuvieron peores resultados que el finalmente elegido (cuatro ligaduras de seda trenzada en las regiones proximal y distal del IoN), estos animales no fueron cuantificados ni analizados para la cuantificación de los resultados. Otros 4 animales tampoco fueron incluidos en el posterior análisis debido a que fueron utilizados para la optimización de la inmunohistoquímica para GABA y/o glicina.

3.2 GRUPO A: ESTUDIO MORFOMÉTRICO Y DE PROYECCIONES

3.2.1 Inyección del trazador y sacrificio de los animales

Este grupo incluye doce ratas a las que se les inyecta una solución acuosa al 20% de HRP (*horseradish peroxidase*; tipo VI, Sigma, St Louis, MO; anexo 1). Esta solución se carga en una jeringa Hamilton de 10 µl. Para ello se anestesia profundamente a las ratas con una mezcla de xilacina y ketamina (5 mg/kg y 80 mg/kg respectivamente) además de dosis adicionales del 25% de estas cantidades en caso de necesidad. En estos animales se realiza mediante un bisturí un corte en la línea media de la cabeza del animal dejando expuestos los huesos frontales y parietales de la calota. Posteriormente se realizan dos orificios en los huesos parietales y se recorta la meninge subyacente para dejar expuesta las regiones de la corteza cerebral por donde posteriormente se realizan las inyecciones mediante una jeringa Hamilton. Siete ratas recibieron bilateralmente 2 inyecciones estereotáxicas en el núcleo ventral posteromedial del tálamo a través de dos orificios fresados en los huesos parietales con las siguientes coordenadas respecto a bregma y la línea media: (AP 2,9; L 2,6), (AP 2,9; L -2,6), (AP 3,9; L 2,4) y (AP 3,9; L -2,4) (Paxinos y Watson, 1988). En cada una de estas coordenadas se realizan depósitos de HRP en tres alturas diferentes con una profundidad de 6,1, 5,6 y 5,1 mm desde la corteza cerebral. Con ello, cada uno de los tálamos recibe aproximadamente 1,2 µl de HRP. En cinco ratas adicionales se realiza una amplia craneotomía del hueso occipital para exponer la superficie del cerebelo. Estos animales reciben un total de 8 inyecciones en cada lado que se localizan de forma visual en la extensión rostrocaudal de la región paravermiana y en la mayoría de la extensión mediolateral del lóbulo cerebeloso posterior. La inyección

profundiza 2 mm bajo la superficie del cerebelo y se inyecta aproximadamente un total de casi 2 μ l de solución en cada hemiserebelo.

Dos días después de la inyección del trazador, las ratas son anestesiadas profundamente con pentobarbital (50 mg/kg intraperitoneal) y perfundidas a través de la aorta ascendente con suero salino (100 ml durante dos minutos a temperatura ambiente), seguido por el fijador. El fijador utilizado con el trazador HRP consiste en una solución al 1% de paraformaldehído y 1,25% de glutaraldehído en un tampón fosfato (PB) 0,1 M a pH de 7,4. Se perfunde este fijador a una temperatura de 10°C, en una cantidad de un litro durante aproximadamente 50 minutos. Posteriormente se perfunde una solución de sacarosa en PB 0,1M (250 ml durante 10 minutos a 10°C). Se extrae el cerebro y los segmentos superiores de la médula espinal y se mantienen en una solución de sacarosa al 30% a 4°C durante 48-72 horas.

3.2.2 Procesamiento del tejido

Tras la crioprotección, los bloques de tejidos fueron congelados y cortados en un microtomo de congelación Leica SM2400 (Leica Microsystems AG, Wetzlar, Alemania) obteniendo secciones en un plano coronal de 50 μ m de espesor. Para ello se pegan las secciones del tronco del encéfalo con Tissue-Tek (Sakura) a la platina del microtomo por la parte rostral en el primer caso y caudal en el segundo. Además se coloca hielo seco alrededor del bloque al principio para congelar bien la parte caudal del tronco del encéfalo ya que corresponde a la médula espinal y, por su altura y menor área, es más fácil que se descongele por ser menor la transmisión del calor hacia la platina. Se recogen los cortes de forma seriada en cuatro placas multipocillo de 12, las dos primeras sobre frío, de modo que se obtienen cuatro series de cortes, cada una de las cuales tiene una serie de secciones con una separación de 200 μ m entre el inicio de una y el inicio de otra. Estas cuatro series de cortes son:

- 1- Serie para el revelado de HRP utilizando tetrametilbenzidina como cromógeno (Mesulam, 1978).
- 2- Serie de reserva.
- 3- Serie de para reacción con citocromo oxidasa (CyO; Wong-Riley, 1979).
- 4- Serie para tinción de Nissl con violeta de cresilo al 0,1%.

Revelado de HRP para microscopía óptica

La HRP es una enzima que cataliza la reacción oxidativa por la cual la diaminobenzidina (DAB) precipita y forma un producto de color negro que puede ser fácilmente distinguido mediante microscopía óptica. La HRP se caracteriza porque es capaz de transportarse retrógradamente a lo largo de los axones por lo que tras la inyección de esta enzima en el tálamo y en el cerebelo, el estudio de los núcleos trigeminales mostrará las neuronas trigeminotalámicas y trigeminocerebelosas en este color oscuro y fácilmente distinguibles de aquellas que no proyectan a estas estructuras y que han sido teñidas con tionina.

El protocolo para el revelado de la HRP es el siguiente:

- 1- Se realizan tres lavados en tampón acetato diluido (0,02M) que constituye la solución de lavado.
- 2- Se introducen las secciones en la solución de incubación (Anexo 2) y se mantienen durante 10 minutos, en agitación y a temperatura ambiente.
- 3- Se añade peróxido de hidrógeno (H_2O_2) hasta que la solución de incubación alcance una concentración de 0,3%.
- 4- Se realizan 3 lavados en la solución de lavado con tampón acetato diluido (0,02M) de unos 5 minutos cada una.
- 5- Se realiza un nuevo proceso de incubación en una solución de incubación como la anterior (Anexo 2) con una concentración de peróxido de hidrógeno de 0,3%.
- 6- Se realizan entre 3 y 6 lavados en tampón acetato 0,02M de 5 minutos cada uno de ellos, en frío y en agitación.
- 7- Las secciones se colocan en los portaobjetos lo antes posible, desde una solución de lavado a 4°.

El protocolo de la contratinción con tionina y deshidratación es el siguiente:

- 1- Los portaobjetos se colocan cestillas de cristal y se dejan secar a temperatura ambiente, protegidos del ambiente y la humedad durante un mínimo de 24 horas.
- 2- Posteriormente las cestillas de cristal con los portaobjetos se introducen en cristalizadores con tionina durante 4-5 minutos. Esta duración de la tinción con tionina es mayor a la sugerida en otros protocolos debido a que en nuestro caso es necesario que las células que no han captado HRP sean fácilmente visibles ya que van a ser cuantificadas.
- 3- Se introducen dos veces las cestillas en solución de lavado (tampón acetato 0,02M) durante 5 segundos cada una.
- 4- Se pasan las cestillas por etanol de 70° ácido durante 15 segundos.

- 5- Se pasan las cestillas por etanol de 96° ácido durante 15 segundos.
- 6- Se pasan dos veces las cestillas por etanol de 100° durante 15 segundos.
- 7- Se desengrasan las preparaciones con xileno durante 45 minutos y se cubren con medio transparente DePeX® (Serva).

Reacción para citocromo oxidasa (CyO)

La enzima citocromo oxidasa forma parte de la cadena respiratoria y se encuentra en las crestas mitocondriales, oxida al sustrato citocromo C en una reacción en la que se desprende oxígeno que, a su vez, oxida la DAB dando lugar a un precipitado de color marrón insoluble. Por todo ello, la reacción para CyO se utiliza como un marcador de actividad metabólica neuronal.

El protocolo para la reacción del CyO es el siguiente:

- 1- Los cortes seriados obtenidos para realizar esta reacción se lavan durante 10-15 minutos en PB 0,1M pH 7,4 para eliminar los posibles restos de sacarosa.
- 2- Las secciones se sumergen en la solución de incubación (Anexo 3) a una temperatura de 37°C en agitación y protegidos de la luz. El tiempo de incubación varía dependiendo de la fijación del tejido y del grado de tinción deseado. Por lo general, se mantiene la reacción durante 3-4 horas, dependiendo de la fijación del tejido controlando visualmente la reacción.
- 3- Se realizan tres lavados en PB 0,1M pH 7,4 en agitación de 5 minutos cada uno.
- 4- Los cortes se montan en portaobjetos gelatinizados desde el tampón PB 0,1M pH 7,4 diluido en 1/3 en agua destilada.
- 5- Las secciones ya colocadas en los portaobjetos se dejan secar a temperatura ambiente, protegidos del ambiente y la humedad durante un mínimo de 24 horas.
- 6- Posteriormente las cestillas de cristal con los portaobjetos se introducen en cristalizadores con etanol al 70% durante 12 horas.
- 7- Se realiza un lavado de corta duración en agua destilada.
- 8- Se pasan las cestillas por etanol de 70° durante 30-60 segundos.
- 9- Se pasan las cestillas por etanol de 96° durante 30-60 segundos.
- 10- Se pasan las cestillas por etanol de 100°.
- 11- Se desengrasan las preparaciones con xileno durante 45 minutos y se cubren con medio transparente DePeX® (Serva).

Tinción de Nissl

La tinción de Nissl permite visualizar los núcleos celulares, los polirribosomas y el retículo endoplasmático rugoso (los llamados gránulos de Nissl), revelándose de este modo la citoarquitectura del tejido. Se basa en la afinidad de los colorantes básicos (en este caso el violeta de cresilo) por las sustancias ácidas como el ADN y el ARN de las células.

El protocolo para la tinción de Nissl es el siguiente:

- 1- Las secciones se montan en portaobjetos gelatinizados desde PB 0,1M pH 7,4 diluido en 1/3 de agua destilada.
- 2- Estos portaobjetos se colocan cestillas de cristal y se dejan secar a temperatura ambiente, protegidos del ambiente y la humedad durante un mínimo de 24 horas.
- 3- Posteriormente las cestillas de cristal con los portaobjetos se introducen en cristalizadores con etanol al 70% durante 12 horas.
- 4- Se realiza un lavado de corta duración en agua destilada.
- 5- Las cestillas con los portaobjetos se introducen en cristalizadores con violeta de cresilo (Anexo 4) a 45° y en agitación durante 4-5 minutos.
- 6- Se realizan dos lavados rápidos en agua destilada para eliminar el exceso de violeta de cresilo.
- 7- Se pasan las cestillas por etanol de 70° durante 30-60 segundos.
- 8- Se pasan las cestillas por etanol de 96° durante 30-60 segundos.
- 9- Se pasan las cestillas por cloroformo al 100% en agitación durante 10 minutos.
- 10- Se pasan las cestillas por etanol de 96°.
- 11- Se pasan las cestillas por el diferenciador (Anexo 4), en agitación y bajo control visual.
- 12- Se pasan las cestillas por etanol de 100°.
- 13- Se desengrasan las preparaciones con xileno durante 45 minutos y se cubren con medio transparente DePeX® (Serva).

3.2.3 Microscopía y fotografía

Las secciones teñidas para Nissl y CyO, así como el material revelado para HRP, fueron estudiadas con un microscopio Olympus BX51 usando lentes planapocromáticas. Cuando se consideró necesario, se realizaron dibujos con cámara lúcida de los núcleos del trigémino y de las estructuras limítrofes. Las microfotografías de las regiones seleccionadas fueron tomadas con un microscopio Nikon Eclipse E600W y una cámara

digital Nikon DXM1200. Se utilizaron los programas Corel Photopaint y Corel Draw para el procesamiento digital de las imágenes en una computadora Dell Opti-Plex. El procesamiento de imágenes se limitó a realizar ajustes en la escala de grises y en el brillo para aumentar la información. Los retoques se limitaron únicamente a las fotografías de baja calidad y en regiones fuera del cerebro.

3.2.4 Estereología

Todos los análisis estereológicos se realizaron con un microscopio Olympus BX51, con la ayuda de una platina motorizada de alta precisión, un lector optoelectrónico de desplazamiento en Z (“*microcator*”) con una resolución de $0,5\mu\text{m}$ (Heidenhain, VZR401), una videocámara JVC TK-C1380 y un monitor de vídeo de alta resolución. Los principales objetivos utilizados fueron lentes secas planocromáticas 4X y 40X y una lente planapocromática de 100X para aceite de inmersión con una gran apertura numérica (1,35). El software utilizado para el control de movimientos de la pletina y la aplicación de test estereológicos fue el CAST GRID (Visiopharm, Horsholm, Dinamarca y Olympus España).

El número de secciones utilizadas variaba según el subnúcleo objeto de análisis. En el Vc se analizó una de cada tres secciones, mientras que en el Vip, el Vo y el Vp se analizaron todas las secciones. En ellas se estableció un punto de inicio aleatorio para la estimación del volumen y del número de neuronas. El número total de neuronas y el de las que proyectan al tálamo o al cerebelo fueron estudiadas mediante el fraccionador óptico, que combina el disector óptico (Sterio, 1984) y el programa de muestreo del fraccionador (Gundersen et al., 1988a). La estimación del volumen de todos los subnúcleos se realizó aplicando el método de Cavalieri.

Estimación del volumen de los subnúcleos del trigémino

El procedimiento de medida se basó en el principio matemático de Cavalieri que se basa en el recuento de puntos asociados a un área que tocan la estructura que se quiere cuantificar. Se dispuso una matriz de puntos sobre las secciones del tronco del encéfalo en las que se había revelado la HRP y se había contrateñido con tionina. El recuento de estos puntos fue utilizado para estimar el volumen ocupado por los diferentes subnúcleos mediante la fórmula:

$$V_i = a(p) \cdot \bar{d} \cdot \sum_{i=1}^n P_i(X) \quad (1)$$

en la que $a(p)$ es el área asociada con cada punto ($13.057 \mu\text{m}^2$), \bar{d} es la distancia media entre cada dos secciones consecutivas estudiadas, que en el caso del Vc es de $150 \mu\text{m}$ ($3 \times 50 \mu\text{m}$) y en el resto de los subnúcleos estudiados de $50 \mu\text{m}$, n es el número de secciones estudiadas en cada subnúcleo que osciló entre 8 y 13 secciones, y

$$\sum_{i=1}^n P_i(X)$$

que es la suma de puntos que tocan la estructura objeto de estudio, en este caso los diferentes subnúcleos del complejo trigeminal.

El proceso de fijación y el revelado de la HRP producen alrededor de un 30% de encogimiento del tejido en área (Bermejo et al., 2003). Ya que no existe un encogimiento detectable a lo largo del eje rostrocaudal, esto supone una estimación del 30% de encogimiento en volumen, el cual se tuvo en cuenta para determinar el volumen de cada uno de los diferentes subnúcleos a partir del tejido revelado para HRP.

La precisión de la estimación individual del volumen (y del número de neuronas como se comentará posteriormente) se evaluó por medio del coeficiente de error (CE), el cual, debido a la naturaleza sistemática del protocolo de muestreo, no puede ser calculado de la manera habitual, DEM/media (Gundersen y Jensen, 1987; Howard y Reed, 1998; García-Fiñana y Cruz-Orive, 2000a). Esto es debido a que los valores obtenidos para cada sección no son independientes y el CE estimado total para el volumen (CE[V]) es una función de dos factores independientes:

1) la varianza de los puntos cuantificados para cada sección, la cual, a lo largo de las secciones y de las fracciones muestreadas da lugar a un error de medida acumulado, denominado efecto “*nugget*” (Geinisman et al., 1996; Avendaño and Dykes, 1996) que se calcula como

$$Nug = 0,0724 \cdot (b \cdot a^{-1/2}) \cdot (n_s \cdot \sum P_i)^{1/2} \quad (2)$$

donde 0,0724 es una constante para las gradillas de puntos cuadráticas, $(b \cdot a^{-1/2})$ es el descriptor de forma para un conjunto de perfiles seccionales y n_s es el número de secciones estudiadas. Los valores medios para $(b \cdot a^{-1/2})$ se estimaron en 4,0 (Vip), 4,5 (Vc, Vp) y 5,0 (Vo) (Gundersen y Jensen, 1987).

2) la varianza debido al muestreo sistemático de las secciones ($Var_{SRS}[\Sigma a]$) la cual depende de cómo el recuento de puntos varía de una sección a otra y se calcula (García-Fiñana and Cruz-Orive, 2000b) como

$$Var_{SRS}[\Sigma a] = \frac{1}{240} \cdot \{3[\Sigma(P_i \cdot P_i) - Nug] - 4\Sigma(P_i \cdot P_{i+1}) + \Sigma(P_i \cdot P_{i+2})\} \quad (3)$$

donde el subíndice i se refiere al número de puntos de una sección dentro de una serie sucesiva y ordenada de secciones. Entonces, la estimación de $CE[V]$ quedaría como

$$CE[V] = \frac{\sqrt{Nug + Var_{SRS}[\Sigma a]}}{\Sigma P_i} \quad (4)$$

Se cuantificaron una media de 881 puntos en cada lado del complejo trigeminal, con un rango para los núcleos individuales entre 138 (Vo) y 301 (Vc) en un total de 26-32 secciones. La media de los CE osciló entre 1,3% y 2,8%. El mayor CE correspondió al Vc y el menor al Vo.

Estimación del número de neuronas en los subnúcleos del trigémino

Las neuronas que captaban HRP eran fácilmente distinguibles de aquellas neuronas contrateñidas con tiónina, así como estas se distinguían sin dificultad de otras células no neuronales. La unidad de cuantificación utilizada fue el plano ecuatorial del núcleo. En las neuronas fuertemente marcadas para HRP, se objetivaba una zona elipsoide de menor intensidad que identificaba la presencia del núcleo.

El número total de neuronas de los subnúcleos Vc, Vip, Vo y Vp se estimó mediante el fraccionador óptico que, como ya se ha comentado, combina un disector óptico y un esquema de muestreo sistemático que es el fraccionador. Las secciones utilizadas fueron las mismas que para la estimación de volumen según el método de Cavalieri.

El fraccionador se utilizó en diferentes etapas. Estas diferentes fracciones sirvieron para calcular la fracción total ($f_T = f_s \cdot f_d \cdot f_h$) del tejido utilizado para cuantificar el número total de neuronas.

- a) Todas las secciones correspondientes al revelado de HRP se montaron en los portaobjetos, lo que significa que al haber obtenido cuatro series de cortes, se montaba una de cada cuatro. De estas secciones montadas, únicamente se utilizaron para la cuantificación una de cada 3 ($f_s = 1/3 \cdot 1/4 = 1/12$) en el Vc, mientras que para el resto de los subnúcleos se utilizaron todas ($f_s = 1/4$).

- b) Cada sección de cada subnúcleo fue dividida en áreas fijas, la primera de las cuales se ubicó aleatoriamente. La platina motorizada del microscopio movilizó la preparación a cada área mediante los movimientos de distancia pre-establecida y fija. Cada una de estas regiones correspondía a un área de $1780 \mu\text{m}^2$ que es una fracción (fd) del total de las áreas muestreadas. La variación de las coordenadas x,y en cada movimiento de la platina fue de $80 \mu\text{m}$.
- c) La altura del disector fue de $14 \mu\text{m}$, así que la fracción del total del espesor seccional que fue muestreada fue $f_h=14/t$, donde t es la estimación del grosor de las secciones estudiadas para cada subnúcleo. La estimación de este grosor fue realizada según los valores del *microcator* de unas diez mediciones por cada sección distribuidas aleatoriamente, realizadas mediante el enfoque desde la superficie hasta la parte más profunda de cada sección. Las secciones congeladas cortadas en micrótopo pueden presentar un encogimiento marcado e irregular, dando lugar a una importante variación en las medidas del espesor. En nuestras secciones congeladas, el encogimiento medio observado según el eje Z (ortogonal al plano de sección) fue del 43%, con un rango entre el 40 y el 49%. Es decir, la t media de todos los subnúcleos fue de $28,5 \mu\text{m}$ en comparación con los $50 \mu\text{m}$ a las que se ajustó el micrótopo, por lo que la $f_h=14/28,5 \approx 1/2$.

El ruido introducido en la cuantificación del número de neuronas por la variabilidad del espesor en cada una de las medidas puede ser controlado aumentando el número de mediciones del grosor y ponderando la contribución de cada sección a la estimación final (Dorph-Petersen et al., 2001; Bermejo et al., 2003). La estimación del espesor medio para la muestra estudiada se obtiene mediante la siguiente fórmula:

$$\bar{t}_{Q^-} = \frac{\sum_{s_1}^{s_n} (\bar{t}_i \sum q_i^-)}{\sum_{s_1}^{s_n} Q^-} \quad (5)$$

donde la \bar{t}_{Q^-} es el valor medio de las secciones sobre el espesor medio por sección \bar{t}_i , ponderada por el número de neuronas por sección, q_i^- .

El número total de neuronas para cada subnúcleo se estimó según la ecuación:

$$N = \sum Q^- \cdot f_T^{-1} \quad (6)$$

donde $\sum Q^-$ es el número total de células cuantificadas en todos los disectores que quedan dentro del perfil de un subnúcleo determinado. Al igual de lo que sucede para las medidas

de volumen, la precisión de la cuantificación del número total de células fue estimada a través del coeficiente de error (CE[N]) que es una función de dos factores independientes: 1) la varianza del número de células contado en cada sección el cual se produce en todas las secciones y fracciones de muestreo y lleva a un error de medida acumulado igual al $\sum Q^-$, y 2) la varianza resultante del muestreo sistemático de la secciones ($Var_{SRS}[\bar{Q}^-]$) que es dada por la ecuación 3, arriba indicada, en la cual, la cuantificación de neuronas (Q_i) sustituye al número de puntos (P_i). Entonces, el coeficiente de error para el número de neuronas queda expresado como

$$CE[N] = \frac{\sqrt{\sum Q^- + Var_{SRS}[\bar{Q}^-]}}{\sum Q^-} \quad (7)$$

Se cuantificaron una media de 970 neuronas por cada lado del complejo trigeminal en un total de 26-32 secciones. El coeficiente de error osciló entre 6,3% y el 8,1% entre los distintos subnúcleos del trigémino, siendo el menor para el Vp y el mayor para el Vo.

Estadística adicional

Las variaciones observadas en el volumen y en la cuantificación del número de neuronas se expresaron en términos relativos por el coeficiente de variación (CV=DE/media, donde DE es la desviación estándar). La varianza observada (OCV_a^2) es la suma de la varianza esperada (ECV_a^2) que representa la variabilidad real entre los animales, y la varianza de las diferencias interindividuales debidas al proceso estereológico, que se expresa mediante CE^2 (Gundersen y Jensen, 1987; West et al., 1991; Geinisman et al., 1996). Ya que OCV es directamente calculada de los datos y que el CE puede ser independientemente estimado como se ha indicado anteriormente de las estimaciones del número de células y del volumen, es posible obtener una buena aproximación de la variabilidad interindividual real.

Las correlaciones entre estos datos como el volumen del complejo trigeminal y el número de neuronas (expresado como la densidad neuronal) se exploraron utilizando estadísticas de regresión (GB-Stat 5.3; Dynamic Microsystems, Silver Spring, Maryland).

3.3 GRUPO B₁. CUANTIFICACIÓN DE LAS NEURONAS INHIBITORIAS DE GABA Y GLICINA. GRUPO CONTROL.

3.3.1 Sujetos, fijación y preparación del tejido

Este grupo incluye finalmente seis ratas Sprague-Dawley que son perfundidas a través de la aorta ascendente bajo anestesia profunda con pentobarbital (50mg/kg intraperitoneal). Tras un breve lavado con suero salino (NaCl 0,9%), durante dos minutos a temperatura ambiente, son perfundidas con 1% paraformaldehído y 2,5% glutaraldehído en buffer fosfato 0,1M a pH 7,4, durante 30-40 minutos (800ml aproximadamente) a temperatura ambiente. Los cerebros son rápidamente extraídos y guardados en la misma solución fijadora durante cuatro horas a una temperatura de 4°C. Tras la postfijación se extrae un bloque que contiene el tronco del encéfalo, el cerebelo y los dos primeros segmentos cervicales de la médula espinal. Se separa posteriormente el cerebelo y el tronco del encéfalo es cortado coronalmente caudal a la salida del V par craneal, quedando, de esta forma el Vp en el bloque rostral y los subnúcleos Vip y Vc. Se obtiene un tercer bloque de corteza cerebral correspondiente al área somatosensorial primaria.

3.3.2 Procesamiento del tejido

Los bloques del tronco del encéfalo y de la corteza cerebral se lavaron en PB y fueron cortados coronalmente en un vibratomo a 80µm. Las secciones fueron recogidas en PB 0,1M frío y distribuidas en cinco series consecutivas:

- 1- Serie para tinción de Nissl con violeta de cresilo al 0,1%.
- 2- Serie de para reacción con citocromo oxidasa (CyO; Wong-Riley, 1979).
- 3- Serie para inmunocitoquímica postinclusión frente a GABA.
- 4- Serie para inmunocitoquímica postinclusión frente a glicina.
- 5- Serie de reserva.

Las secciones teñidas con Nissl y CyO fueron utilizadas para delimitar el núcleo del trigémino y el área somatosensorial primaria. Los protocolos de ambas tinciones se han descrito con anterioridad, con la única diferencia de que los cortes deben estar 24 horas en la solución de incubación de CyO (Anexo 3) en lugar de las 3-4 horas que se recomendaba en el apartado 3.2.2 al haber utilizado una concentración de glutaraldehído mayor.

Inclusión en Durcupan

Se seleccionaron entre tres y cuatro secciones de vibratomo de distintos niveles rostrocaudales de los subnúcleos Vc y Vp y del área de barriles de la corteza cerebral. En el Vc la separación entre estos cortes fue de unos 1600 μm , en el Vp de 400 μm y en la corteza cerebral de unos 800 μm . Además, se tomaron secciones adicionales del Vip de dos animales.

El protocolo para la inclusión de estas secciones en Durcupan es el siguiente:

- 1- Las secciones seleccionadas se mantienen durante una noche completa en PB 0,1M a 4°C.
- 2- Se colocan los cortes entre dos láminas de papel de filtro empapadas de PB 0,1M y se sitúan en placas de vidrio donde poder llevar a cabo la reacción.
- 3- Se añade una solución de osmio (1% OsO₄ en 0,1M PB) sobre los cortes seleccionados y se mantiene durante una hora. Esta reacción se lleva a cabo sobre hielo, en campana y en ausencia de luz.
- 4- Se realizan dos lavados en PB 0,1M durante 10 minutos cada uno.
- 5- Los cortes seleccionados se pasan por alcohol de 60° en frío durante 5 minutos.
- 6- Los cortes se pasan por alcohol de 70° en frío durante 5 minutos.
- 7- Se pasan por alcohol de 80° en frío durante 5 minutos.
- 8- Se pasan por alcohol de 96° en frío durante 5 minutos.
- 9- Se pasan dos veces por alcohol de 100° en frío durante 5 minutos.
- 10- Se pasan dos veces por óxido de propileno durante 10 minutos, la primera vez en frío.
- 11- Se pasan por alcohol de 60° en frío durante 5 minutos.
- 12- Se pasan por una disolución compuesta por óxido de propileno y Durcupan al 50% y se dejan en ella durante toda la noche.
- 13- Se pasan por Durcupan durante 4 horas.
- 14- Los cortes se colocan entre dos láminas de acetato ACLAR (Ted Pella, Inc., Redding, CA) que quedan pegadas por Durcupan y se dejan secar en una estufa a 57°C durante dos días. Se coloca un peso de aproximadamente 240g para garantizar que estos cortes quedan planos
- 15- Se separa la lámina superior de acetato ACLAR exponiendo una de las caras de los cortes seleccionados.
- 16- Sobre la cara expuesta de estos cortes se pega un cilindro de Durcupan previamente preparado (Anexo 5) mediante Durcupan líquido.

17- Estos bloques de tejido se dejan secar en una estufa a 57°C durante aproximadamente dos días.

18- Posteriormente se separa la lámina de acetato ACLAR que quedaba de tal modo que quedan bloques de Durcupan con la región del complejo trigeminal o de la corteza cerebral que se quiere estudiar en uno de sus extremos.

De cada uno de estos bloques se obtienen entre 32 y 48 secciones semifinas de 1 µm de espesor mediante un cuchillo de diamante (Drukker International, The Netherlands) en un ultramicrotomo "Leica Ultracut". Estas secciones se distribuyeron de forma alternante que fueron montadas por separado sobre portas gelatinizados. Estas series se usaron respectivamente para inmunocitoquímica con GABA, glicina, toluidina y reserva. Unas secciones adicionales se montaron para ser usadas como controles negativos. Secciones de las laminillas cerebelosas se utilizaron como controles de referencia positivos ya que está bien demostrada la presencia de GABA y glicina en el córtex cerebeloso (Ottersen et al., 1988).

Inmunocitoquímica postinclusión para GABA y glicina

El procedimiento es similar al propuesto originalmente por Somogyi (Somogyi et al., 1984), con modificaciones (Del Río y De Felipe, 1996). En resumen, todas las secciones fueron tratadas con una mezcla de etanolato sódico y óxido de propileno, deosmicadas y lavadas en agua destilada. Las secciones reservadas para el marcaje de glicina fueron tratadas con borohidruro sódico al 0,2% en búffer de fosfato sódico, a pH 7,4 (PBS) durante 10 minutos. La inmunocitoquímica consiste en la siguiente secuencia de incubaciones en una cámara húmeda, a temperatura ambiente, y con minuciosos lavados con buffer entre cada uno de los pasos:

1.- Incubación durante 30 minutos en un medio de incubación (MI) compuesto de: 2% de albúmina de suero bovino y 5% de suero de carnero o caballo en PBS.

2.- Anticuerpos monoclonales anti-GABA (1:250; clon 3D5, Matute y Streit, 1986) o anticuerpos policlonales anti-glicina obtenidos en conejo (1:1000; Ab139, Chemicon Europe, Hampshire, UK) en el medio de incubación durante toda una noche.

3.- IgG biotinilada horse-anti-mouse o goat-anti-rabbit (1:50; Chemicon) en medio de incubación durante 60 minutos.

4.- Complejo avidina-biotina-peroxidasa (ABC, 1:250; Vector Labs., Burlingame, CA) en PBS, durante 90 minutos.

5.- Diaminobenzidina (DAB, 0,05%; Sigma, St. Louis, MO, USA) en PBS durante 10 minutos.

6.- DAB con adición de H₂O₂ (0'003% del stock a 30%).

La intensidad de la tinción se comprueba cada pocos minutos bajo microscopio. Cuando la tinción es satisfactoria, la reacción se para lavando las secciones varias veces en buffer fosfato frío. Posteriormente, la tinción se intensifica mediante la inmersión de las secciones en 0,02% OsO₄ en buffer fosfato durante dos minutos. Tras tres lavados en PB, las secciones son deshidratadas en alcohol, tratadas con xileno y cubiertas con DePeX.

Se utilizaron controles negativos en los cuales se omite el segundo paso y sustituyéndolo por un aumento del tiempo en el medio de incubación y preadsorbiendo los anticuerpos primarios con conjugados BSA frente a GABA o glicina. Estos conjugados se prepararon utilizando 50 μmoles de GABA o glicina, 6mg de BSA y 50μmoles de glutaraldehído (todos ellos de Sigma) en 1 ml de PB 0,1M (Matute y Streit, 1986). La preadsorción se realizó incubando el anticuerpo con el correspondiente conjugado a 60 (GABA, 1:250) o 120 (glicina, 1:1000) μg/ml (concentración de las proteínas) durante dos horas a temperatura ambiente.

3.3.3 Microscopía, fotografía y densitometría

Al igual que para el estudio morfológico y de proyecciones se utilizó un microscopio Olympus BX51 con lentes planapocromáticas para estudiar el tejido y las fotografías fueron tomadas con un microscopio Nikon Eclipse E600W y una cámara digital NiKon DXM1200. También se utilizaron los programas Corel Photopaint y Corel Draw para el procesamiento digital de las imágenes en una computadora Dell Opti-Plex aunque nuevamente se limitó a realizar ajustes en la escala de grises y en el brillo para aumentar la información. Los retoques se limitaron a las fotografías de baja calidad y en regiones fuera del cerebro.

Para facilitar el estudio de la colocalización de las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas se representaron todos los perfiles neuronales de secciones consecutivas del Vc y del Vp en un papel utilizado una cámara lúcida a 400x.

La clasificación de los somas neuronales en los cortes semifinos fue en tres grupos: débilmente marcado, fuertemente marcado y no marcado. Esta separación se realizó de acuerdo a una evaluación subjetiva de diferentes rasgos de la tinción. En todos los núcleos del trigémino existen cuerpos neuronales que expresan GABA y/o glicina. Para

ambos marcadores, existe un rango continuo de tinción nuclear o citoplasmática, desde débil a muy fuerte. En todos los casos, la calidad de la reacción positiva fue comprobada verificando la presencia de un marcaje muy fuerte de los botones del neuropilo, cestas alrededor de las células de Purkinje del cerebelo y cuerpos celulares en diferentes regiones, incluyendo los núcleos trigeminal y paratrigeminal. El marcaje fue considerado "fuerte" siempre y cuando el citoplasma fuese marcadamente más oscuro que los perfiles no marcados, ya fuesen de otros citoplasmas o dendritas. La intensidad del marcado nuclear era generalmente similar al del citoplasma, aunque ocasionalmente se encontraba menos marcado (particularmente para las neuronas gabaérgicas). Las neuronas débilmente marcadas son aquellas en las que el citoplasma aparece únicamente un poco más oscuro que las neuronas negativas o no marcadas, manteniendo el núcleo el mismo grado de tinción o un poco menor al del citoplasma (figura 3). Cuando quedaba duda, las células fueron clasificadas como débiles.

Los resultados iniciales de este procedimiento fueron comprobados mediante un análisis densitométrico, utilizando el software de análisis de imágenes Scion Image para Windows (rel. Beta 4.0.2, Scion Corp., www.scioncorp.com). Se tomaron dieciséis microfotografías de cortes semifinos teñidos para GABA y para glicina del Vc del trigémino en dos ratas utilizando la anteriormente mencionada cámara Nikon. Las fotografías fueron guardadas a alta resolución en un formato TIFF en blanco y negro. Se seleccionaron manualmente 300 campos rectangulares de cuerpos neuronales y se asignó un valor en la escala de grises de forma automática por el software Scion. Los valores obtenidos fueron normalizados utilizando los valores de gris del lumen de los vasos sanguíneos de las mismas secciones. El proceso de normalización se realizó de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$VGN_n(-,+,+++)=VG_n(-,+,+++)/VG_v$$

donde $VGN_n(-,+,+++)$ representa el valor en la escala de grises normalizado para neuronas no marcadas (-), neuronas débilmente marcadas (+) y neuronas fuertemente marcadas (+++). $VG_n(-,+,+++)$ es la lectura obtenida para cada célula y VG_v representa la media de las medidas obtenidas para el lumen de los vasos sanguíneos en una sección dada (Avendaño et al., 2005).

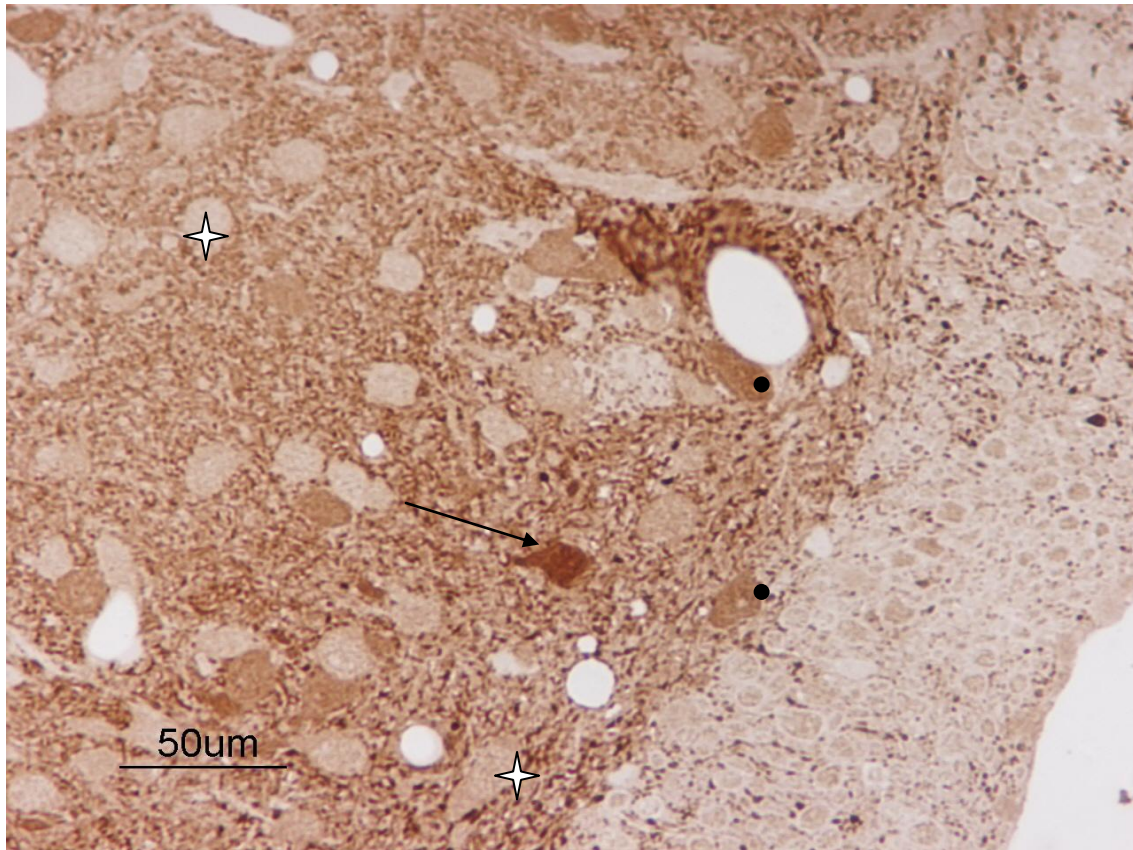


Figura 3. Espectro de intensidad de tinción de neuronas gabaérgicas. Se puede ver como existen neuronas fuertemente marcadas, como la marcada con una flecha, débilmente marcada, como la marcada con una estrella.

3.3.4 Estereología

El análisis estereológico se llevó a cabo con un microscopio Olympus BX51, con la ayuda de una platina de alta precisión, un lector optoelectrónico de desplazamiento en Z de 0,5 μ m de resolución, una videocámara JVC TK-C1380 y un monitor de vídeo de alta resolución. Los principales objetivos utilizados fueron lentes planocromáticas 4X y 40X. El software utilizado para el control de movimientos de la pletina y la aplicación de test estereológicos fue el CAST GRID (Visiopharm, Horsholm, Dinamarca y Olympus España) y la computadora utilizada fue una Dell OptiPlex.

Estimación del número de neuronas: disector físico.

La densidad numérica de neuronas gabaérgicas y glicinérgicas fue estimada aplicando el método del disector físico (Sterio, 1984; Howard y Reed, 1998) a pares de cortes semifinos de 1 μm de espesor, con una separación de 4 μm entre pares. Las secciones muestreadas fueron alineadas y muestreadas automáticamente mediante desplazamientos de la platina controlados por el software CAST. Los campos estudiados fueron muestreados sistemáticamente cada 22.000-40.000 μm^2 en las secciones utilizando lentes de 40x, con una magnificación total en la pantalla del monitor de 1630x. Sobre estas secciones se situó un marco de cuantificación y se marcaron los perfiles neuronales que reunían los criterios de cuantificación según el método del disector físico, en ambas direcciones.

El número total de células se estimó a partir de la siguiente ecuación:

$$N = N_V \cdot V(\text{ref}) \quad (8)$$

en la cual N representa el número total de células, N_V representa el número total de células cuantificadas y $V(\text{ref})$ representa el volumen total del que es están obteniendo los datos, en este caso el núcleo del trigémino y la corteza cerebral. El volumen de referencia con el que se trabajó fue obtenido a partir de los animales del “grupo A: estudio morfométrico y de proyecciones” que utilizó el método de Cavalieri para la obtención de los volúmenes.

La precisión en la cuantificación fue determinada utilizando el coeficiente de error (CE). El CE total es función de dos factores independientes: 1) la varianza de las células contadas en cada sección, que para fracciones de muestreo $\ll 1$ tiende a ser igual a $\sum Q$ y 2) la varianza debida al muestreo sistemático de las secciones ($\text{Var}_{\text{SRS}}[\bar{Q}]$) que es dado por la ecuación siguiente (García-Fiñana y Cruz Orive, 2000a) y depende de la variación del número de células de una sección a la siguiente:

$$\text{Var}_{\text{SRS}}[\sum a] = \frac{1}{240} \cdot \left\{ 3 \left[\sum (P_i \cdot P_i) - \text{Nug} \right] - 4 \sum (P_i \cdot P_{i+1}) + \sum (P_i \cdot P_{i+2}) \right\} \quad (9)$$

En esta ecuación P_i representa los puntos contados en lugar de las células cuantificadas y Nug representa el efecto *nugget* o error de medida acumulado (Geinisman et al., 1996; Avendaño y Dykes, 1996), equivalente a:

$$\text{Nug} = 0.0724 \cdot (b \cdot a^{-1/2}) \cdot (n \cdot \sum P_i)^{1/2} \quad (10)$$

En este caso 0,0724 es un valor constante para retículas cuadráticas, $(b \cdot a^{-1/2})$ es el descriptor de forma para un conjunto de perfiles seccionales y n es el número de secciones estudiadas. Los valores medios para $(b \cdot a^{-1/2})$ se estimaron en 4,0 (Vip), 4,5 (Vc, Vp) y 5,0 (Vo) (Gundersen y Jensen, 1987).

De esta forma, el coeficiente de error se obtiene con la fórmula (11).

$$CE[N] = \frac{\sqrt{\sum Q^- + Var_{SRS}[\bar{Q}^-]}}{\sum Q^-} \quad (11)$$

Los coeficientes de error estimados se encontraban en un rango entre 0,5 y 6,6%.

Corrección de volumen para el encogimiento del tejido.

El encogimiento del tejido producido por la inclusión en resina se estimó previamente comparando, en secciones consecutivas del tronco del encéfalo, las medidas obtenidas para las secciones incluidas en resina y las obtenidas directamente del vibratomo. Se obtuvo una media del 8% de encogimiento en área, y un 12% de encogimiento en volumen. El encogimiento adicional producido por la fijación del tejido fue ignorado, aunque pudiese ser responsable de cambios menores en la estimación del número total de neuronas (ver Discusión).

Estudios de colocalización.

En dos animales se realizó un estudio de colocalización. Para ello los perfiles de varios somas neuronales de diferentes pares de cortes semifinos marcados para GABA y para glicina de los subnúcleos Vc, Vip y Vp fueron dibujados en papel utilizando una cámara lúcida y una lente de 40x. Los perfiles marcados fueron clasificados siguiendo un código de colores en nueve grupos dependiendo del marcaje de la inmunotinción para GABA o glicina en todas sus posibles combinaciones.

La colocalización de estas tinciones también fue cuantificada en pares de cortes semifinos del Vc de tres ratas utilizando el mismo protocolo de muestreo proporcionado por el CAST-GRID para el disector físico. Se estudiaron y clasificaron un total de 1.080 perfiles neuronales.

Estadística adicional

El número total de neuronas de los diferentes grupos neuronales se describieron utilizando medias y desviaciones típicas. Las variaciones observadas en el número de células entre los diferentes grupos de animales se expresaron en términos relativos mediante el coeficiente de variación ($CV=DEM/media$, donde DEM es la desviación estándar de la media). La varianza observada (OCV_a^2) es la suma de la varianza esperada (ECV_a^2) que representa la variabilidad real entre los animales, y la varianza interindividual debida al proceso estereológico, que se expresa mediante CE^2 (Gundersen y Jensen, 1987; West et al., 1991; Geinisman et al., 1996). Se aplicó el test de Wilcoxon para dos grupos correlacionados para evaluar las diferencias de lado entre los grupos, así como las diferencias intranucleares rostrocaudales en el Vc.

3.4 GRUPO B₂. CUANTIFICACIÓN DE LAS NEURONAS INHIBITORIAS DE GABA Y GLICINA. GRUPO TRATADO CON CCI-IoN

3.4.1 Constricción crónica del nervio infraorbitario (CCI-IoN). Desarrollo de un modelo de dolor neuropático

Este grupo incluye finalmente cuatro ratas Sprague-Dawley que son anestesiadas profundamente mediante una mezcla de ketamina (Ketolar®), xilacina (Rompún®) y atropina en una proporción de 1:1/3:1/6 respectivamente, en una dosis de 2 ml/kg de peso del animal por vía intramuscular. Además se utilizaron dosis adicionales del 25% de estas cantidades en caso de necesidad. La cirugía se realizó considerando importantes las condiciones asépticas del lugar de la operación.

Los estudios preliminares para la optimización del modelo de dolor neuropático no son incluidos en esta Tesis, se realizaron sobre otras ratas e incluyeron diferentes versiones de la ligadura del IoN, y la aplicación de test de conducta nociceptiva. Una de las versiones anteriores se expone en la figura 4:

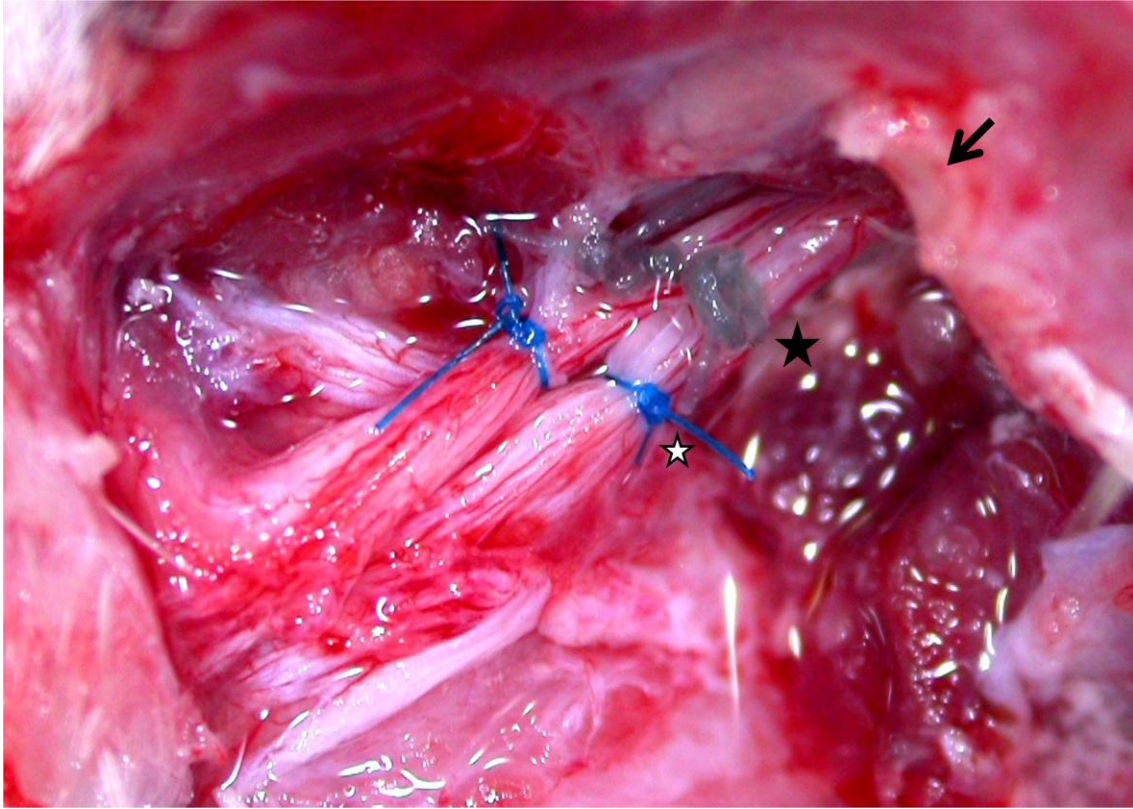


Figura 4. CCI-IoN. Estudio preliminar. Esta figura muestra la realización de una CCI-IoN mediante dos tipos de ligaduras distintas: una doble ligadura proximal con catgut, indicada mediante la estrella negra y una doble ligadura distal con polipropileno (Prolene®), indicada mediante la estrella blanca. La flecha indica la erosión que se realiza en el hueso cigomático con el objetivo de realizar las ligaduras los más proximales posible.

La cirugía se inicia colocando al animal anestesiado sobre la mesa en posición lateral dejando expuesto el lado izquierdo. Toda la cirugía se desarrolla bajo un microscopio quirúrgico (Tipo II de Zeiss-Jena). El procedimiento quirúrgico se inicia practicando una incisión en forma de C por detrás de la zona de vibras y por delante del ojo en el lado izquierdo del animal. Se separa cuidadosamente la piel ayudándose de una torunda de algodón y se retraen los músculos zigomáticos y masetero profundo hasta llegar al arco zigomático y exponer el IoN (figura 5), donde se verá sin dificultad el orificio infraorbitario por donde emerge el nervio. Éste se disecciona hasta el foramen infraorbitario para localizar las dos ramas en las que se bifurca a la salida del agujero zigomático y para separarlo completamente del resto del tejido. Con una gubia se elimina la región lateral del orificio de salida del IoN para llegar a localizar la región más proximal del nervio. Se advierte que el IoN se encuentra dividido en dos porciones: un fascículo medial, más

compacto, y un fascículo lateral, más grueso que el anterior, pero también más laxo. La disposición de tales fascículos puede apreciarse en la misma figura.



Figura 5. IoN separado del resto del tejido por un hilo de sutura de seda.

Tras diseccionar y exponer los dos fascículos del IoN se realizan un total de cuatro ligaduras de seda de 6/0 (Lorca Marín): una anterior y una posterior en cada uno de los dos fascículos. La disposición de tales ligaduras puede verse en la figura 6. Esta intervención es una modificación del modelo clásico de CCI-IoN (Vos et al., 1994). En este modelo original se realizaba una sola constricción abrazando a todo el IoN, mientras que en esta modificación se realizan dos constricciones por cada fascículo. Las ligaduras se hacen con un nudo doble con ayuda de pinzas y tijeras microquirúrgicas. Por último se irriga la zona con suero fisiológico estéril y se sutura la piel con hilo de seda de 2/0 (Lorca Marín). Se añade cloranfenicol pulverizado (Veterin Tenicol, Intervet) en la zona de incisión para prevenir infecciones y se le administra una inyección subcutánea de suero fisiológico dejando al animal que se recupere de la anestesia.

Estas ligaduras se colocan únicamente en el IoN izquierdo, actuando el lado contralateral como control.



Figura 6. Se exponen los dos fascículos del IoN y las cuatro ligaduras de seda 6/0.

3.4.2 Evaluación de los animales. Test nociceptivos

Los animales son explorados el día anterior a la cirugía y cada tres meses durante el mes siguiente, según los métodos descritos con anterioridad (Vos et al., 1994; Idänpään-Heikkilä y Guilbaud, 1999; Christensen et al., 1999). Antes de llevar a cabo la exploración, los animales se situaron de forma aislada en una caja de observación a la que se adaptaron durante un período de dos horas. Tras este período de habituación se procedió a medir la sensibilidad mecánica de los animales mediante filamentos de Von Frey con capacidad para ofrecer determinadas presiones.

Antes de comenzar la exploración, se tocaban las paredes de la caja con una varilla similar a la de los pelos de Von Frey y se palpaba a la rata para que se acostumbrase al explorador. Tras este proceso de adaptación que llevaba alrededor de dos minutos, se iniciaba la serie de estimulaciones mecánicas repetidas.

Los estímulos se aplicaron en el territorio inervado por el IoN, en el centro de la región correspondiente al área de vibrisas. Los filamentos se aplicaban hasta el punto de doblarse y se exploraba en primer lugar el lado contralateral y posteriormente al lado en el que había sido intervenido el IoN.

Cada uno de los filamentos se aplicaba un total de cinco veces, siempre comenzando por los filamentos que ejercían una presión menor y se consideraba como respuesta positiva a

aquella en la que el animal realizaba tres maniobras de retirada ante un mismo filamento. Se utilizó una colección de pelos de von Frey que incluían las siguientes medidas: 0,008g, 0,04g, 0,16g, 0,4g, 0,6g, 1,0g, 1,4g, 2,0g, 4,0g, 8,0g, 10g, 26g y 100g. La aproximación con los pelos de von Frey al área estudiada se realizó de forma lenta para evitar las respuestas de sorpresa del animal. Se consideraba una maniobra de retirada positiva cuando se cumplía alguno de los siguientes tres supuestos:

- A- Retirada de la cabeza de la rata para evitar el contacto con el filamento.
- B- Maniobras de huida o de ataque realizadas por el animal con el objeto de evitar contacto con el filamento.
- C- Movimientos de gesticulación asimétricos de la cara.

En caso de existir una respuesta positiva, la siguiente estimulación mecánica no se realizaba hasta que hubiesen pasado un mínimo de 20 segundos desde que el animal hubiese vuelto a su posición primaria. El filamento de mayor grosor utilizado fue el capaz de aplicar una fuerza de 100g considerando las respuestas negativas a este filamento como anestesia completa del animal ante los estímulos mecánicos. La elección de este filamento como fuerza máxima se realizó para prevenir un posible daño tisular de la rata y porque era capaz de desplazar pasivamente la cabeza del animal. Estas maniobras se realizaron cada tres días desde la cirugía hasta el día 30, momento en el cual los animales fueron sacrificados. Estos test nociceptivos siempre fueron realizados en una habitación tranquila y por la misma persona. El esquema temporal utilizado en la exploración de estos animales se representa en la figura 7.

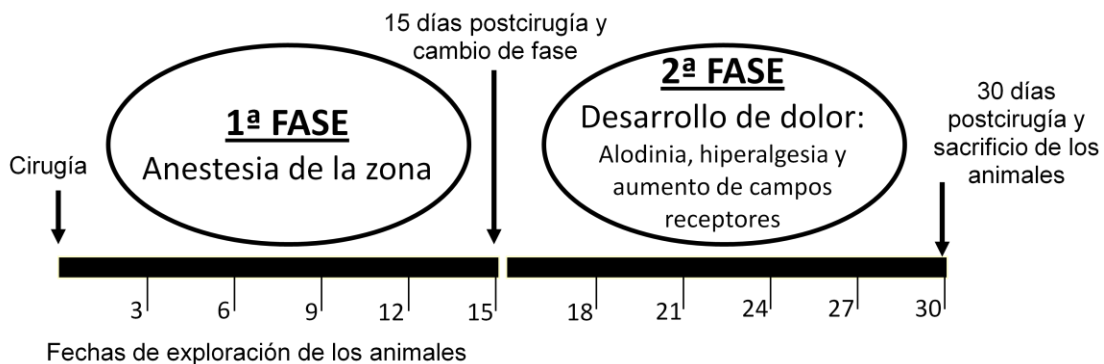


Figura 7. Esquema temporal de la exploración de los animales sometidos a CCI.

También se observó un mayor un mayor toqueteo de la hemicara del lado intervenido que del contralateral (acicalamiento o *grooming facial*), sobre todo en la primera fase de la exploración (fase anestésica). Este hallazgo no se estudió de forma cuantitativa.

3.4.3 Fijación y procesamiento del tejido

Tras el mes de seguimiento y exploraciones repetidas de los animales, éstos fueron sacrificados del mismo modo que en el grupo control. El procesamiento del tejido y las distintas tinciones y reacciones inmunocitoquímicas también fueron iguales al grupo control.

3.4.4 Estereología

Los procedimientos estereológicos y el equipo utilizado fue el mismo que para el grupo control. Sin embargo, se estudiaron por separado los lados derecho e izquierdo del animal. El complejo trigeminal izquierdo y la CxSS derecha se consideraron las regiones correspondientes al IoN que se había intervenido, mientras que el complejo trigeminal derecho y la CxSS izquierda se consideraron como los lados “controles” de los animales operados. Estos lados se compararon entre ellos y con el grupo control mediante el test estadístico de Wilcoxon. Los niveles de significación estadística que se tuvieron en cuenta fueron $P < 0,05$, $P < 0,01$ y $P < 0,001$.

3.5 GRUPO B₃. CUANTIFICACIÓN DE LAS NEURONAS INHIBITORIAS DE GABA Y GLICINA. GRUPO TRATADO CON GBP

3.5.1 Sujetos empleados y administración de GBP

Este grupo incluye seis ratas Sprague-Dawley que son tratadas con GBP durante tres días previamente a su sacrificio y obtención del tejido. La GBP se obtiene de las cápsulas comercializadas de neurontin® de 400mg que se abren y se obtiene la dosis de GBP correspondiente en una balanza de precisión (Mettler H51). La cantidad que se administra de neurontin® en cada inyección es de 150 mg/kg de peso del animal (aproximadamente 40 mg por animal y dosis), lo que supone 112,5 mg de GBP por cada kilogramo de peso del animal, ya que la composición de las cápsulas de neurontin® es 75% de GBP y el

25% de excipientes. Esta cantidad que se va a utilizar se disuelve en 0,5 ml de suero fisiológico y se inyecta posteriormente de forma subcutánea en la rata. Se realizan un total de cinco inyecciones en cada uno de los animales con una separación entre cada una de ellas de 12 horas. Entre la última inyección y el sacrificio y perfusión de los animales se deja pasar 24 horas. El esquema temporal de la administración de la GBP y del sacrificio de los animales se representa en la figura 8.



Figura 8. Esquema temporal de la administración de la GBP.

3.5.2 Fijación y procesamiento del tejido

Tras la administración de GBP a los animales, éstos fueron sacrificados del mismo modo que en el grupo control. El procesamiento del tejido y las distintas tinciones y reacciones inmunocitoquímicas también fueron iguales a las de dicho grupo.

3.5.3 Estereología

Los procedimientos estereológicos y el equipo utilizado fue el mismo que para el grupo control. Los datos obtenidos se compararon entre ellos con los el grupo control mediante la prueba paramétrica de la t de Student. Los niveles de significación estadística que se tuvieron en cuenta fueron $P < 0,05$, $P < 0,01$ y $P < 0,001$.

3.6 GRUPO B₄. CUANTIFICACIÓN DE LAS NEURONAS INHIBITORIAS DE GABA Y GLICINA. GRUPO INTERVENIDO MEDIANTE CCI-IoN Y TRATADO CON GBP

3.6.1 Preparación de los animales

Este grupo incluye tres ratas Sprague-Dawley que son intervenidas mediante una CCI-IoN realizada del mismo modo a como se explica en el apartado 3.4.1. La exploración posterior de los animales también se realiza cada tres días a lo largo de la primera fase o anestésica y segunda fase o de desarrollo del dolor y del mismo modo a como se ha comentado en el apartado 3.4.2. Durante los días 27, 28 y 29 posteriores a la cirugía se administra GBP a los animales. El tratamiento con este fármaco se realiza de modo similar al descrito en el apartado 3.5.1, a partir de las cápsulas comercializadas de neurontin® 400 mg e inyectando 112,5 mg por cada kilogramo de peso del animal cada 12 horas y de forma subcutánea. Al igual que en el caso anterior, se realizan un total de cinco inyecciones en cada uno de los animales administrándose un total de 562,5 mg de GBP por cada kilogramo de peso del animal. Entre la última inyección y el sacrificio y perfusión de los animales se deja pasar 24 horas. El esquema temporal de la administración de la GBP y del sacrificio de los animales se representa en la figura 9.

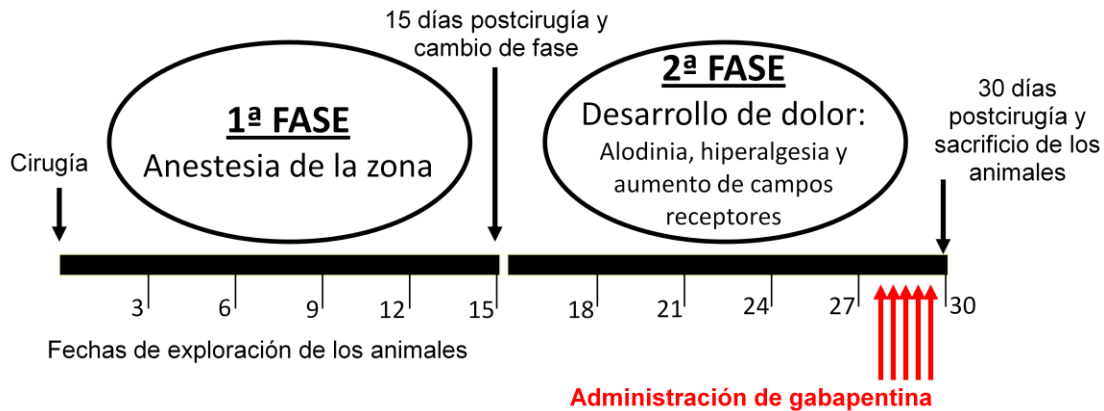


Figura 9. Esquema temporal de la cirugía, las exploraciones y la administración de la GBP en los animales sometidos a una CCI- IoN y tratamiento con GBP.

3.6.2 Fijación y procesamiento del tejido

Tras el mes de seguimiento, las exploraciones repetidas y la administración de GBP a los animales, éstos fueron sacrificados del mismo modo que en el grupo control (apartado 3.3.1). El procesamiento del tejido y las distintas tinciones y reacciones inmunocitoquímicas también fueron iguales al grupo control (apartado 3.3.2).

3.6.3 Estereología

Los procedimientos estereológicos y el equipo utilizado fue el mismo que para el grupo control (apartados 3.3.3 y 3.3.4). Sin embargo, se estudiaron por separado los lados derecho e izquierdo del animal. El complejo trigeminal izquierdo y la CxSS derecho se consideraron las regiones correspondientes al IoN que se había intervenido, mientras que el complejo trigeminal derecho y la CxSS izquierda se consideraron como los lados “controles” de los animales operados. Estos lados se compararon entre ellos y con los grupos control y tratado mediante CCI. Los niveles de significación estadística que se tuvieron en cuenta fueron $P < 0,05$, $P < 0,01$ y $P < 0,001$.

3.7 GRUPO C. ANÁLISIS DE LAS NEURONAS DE PROYECCIÓN QUE EXPRESAN GABA Y/O GLICINA

3.7.1 Inyección del trazador y sacrificio de los animales

Este grupo incluye dos ratas Sprague-Dawley a las que se les inyecta una solución acuosa al 20% de HRP del mismo modo al comentado en el apartado 3.2.1. Para ello se anestesia profundamente a las ratas con una mezcla de xilacina y ketamina (5mg/kg y 80mg/kg respectivamente) además de cantidades adicionales del 25% en caso de necesidad. Estas dos ratas recibieron 12 depósitos estereotáxicas mediante una jeringa Hamilton en el núcleo ventral posteromedial del tálamo a través de dos orificios fresados en los huesos parietales con las mismas coordenadas que las anteriormente comentadas: (AP 2,9; L 2,6), (AP 2,9; L -2,6), (AP 3,9; L 2,4) y (AP 3,9; L -2,4) (Paxinos y Watson, 1986). Nuevamente, en cada una de estas coordenadas se realizan depósitos de HRP en tres diferentes alturas con una profundidad de 6,1, 5,6 y 5,1mm desde la corteza cerebral. Con ello, cada uno de los tálamos recibe aproximadamente 1,2 µl de HRP.

Dos días después de la inyección del trazador, las ratas son anestesiadas profundamente con pentobarbital (50 mg/kg intraperitoneal) y perfundidas a través de la aorta ascendente

con suero salino (100 ml durante dos minutos a temperatura ambiente), seguido por el fijador. El fijador utilizado en este caso, consiste en una solución al 1% de paraformaldehído y 2,5% de glutaraldehído en un PB 0,1M a pH de 7,4. Se perfunde a temperatura ambiente, en una cantidad de un litro durante aproximadamente 50 minutos. Los cerebros son rápidamente extraídos y guardados en el buffer de fijación durante cuatro horas a una temperatura de 4°C. Tras la postfijación se extrae un bloque que contiene el tronco del encéfalo, el cerebelo y los dos primeros segmentos cervicales de la médula espinal. Se separa posteriormente el cerebelo y el tronco del encéfalo es cortado coronalmente caudal a la salida del V par craneal, quedando, de esta forma el Vp en el bloque rostral y los subnúcleos Vip y Vc.

3.7.2 Procesamiento del tejido

Los bloques del tronco del encéfalo y de la corteza cerebral se lavaron en PB y fueron cortados coronalmente en un vibratomo a 80µm. Las secciones fueron recogidas en PB 0,1M frío y distribuidas en cinco series consecutivas:

- 1- Serie para tinción de Nissl con violeta de cresilo al 0,1%.
- 2- Serie de para reacción con citocromo oxidasa (CyO; Wong-Riley, 1979).
- 3- Serie para inmunocitoquímica postinclusión frente a GABA o glicina.
- 4- Serie para inmunocitoquímica postinclusión frente a GABA o glicina.
- 5- Serie de reserva.

Las secciones teñidas con Nissl y CyO fueron utilizadas para delimitar el núcleo del trigémino. Los protocolos de ambas tinciones se han descrito con anterioridad (3.2.2).

De las secciones utilizadas para la inmunocitoquímica postinclusión frente a GABA o glicina, se seleccionaron tres de los niveles rostrocaudales de los subnúcleos Vc y Vp. En estas secciones se reveló el HRP (apartado 3.3.2. Revelado de HRP para microscopía óptica) y posteriormente fueron incluidas en Durcupan siguiendo el mismo protocolo que se ha comentado con anterioridad (apartado 3.3.2. Inclusión en Durcupan). De cada uno de estos bloques se obtuvieron varias secciones semifinas de 1 µm de espesor mediante un cuchillo de diamante (Drukker International, The Netherlands) en un ultramicrotomo "Leica Ultracut" que se usaron respectivamente para inmunocitoquímica con GABA y glicina, toluidina y reserva. Unas secciones adicionales se montaron para ser usadas como controles negativos. Secciones de las laminillas cerebelosas se utilizaron como controles de referencia positivos.

La inmunocitoquímica postinclusión para GABA y glicina se realiza del mismo modo al propuesto con anterioridad (apartado 3.3.2).

3.7.3 Microscopía, fotografía y análisis cuantitativo

Del mismo modo que para los estudios anteriores se utilizó un microscopio Olympus BX51 con lentes planapocromáticas para estudiar el tejido con un microscopio Nikon Eclipse E600W y una cámara digital NiKon DXM1200 para la realización de las fotografías. Nuevamente se utilizaron los programas Corel Photopaint y Corel Draw para el procesamiento digital de las imágenes en una computadora Dell Opti-Plex.

Se realizó un muestreo sistemático de los núcleos Vp y Vc visualizando 140 campos por cada subnúcleo (70 para GABA y 70 para glicina). Se identificaron con facilidad las neuronas gabaérgicas o glicinérgicas debido a su tinción marronácea y las neuronas marcadas con HRP por la existencia de un punteado negro en su soma. A lo largo de este muestreo se buscó la presencia de neuronas que simultáneamente expresasen GABA y/o glicina y que presentasen HRP en su interior.

3.8 ANÁLISIS ESTADÍSTICO Y PRESENTACIÓN DE RESULTADOS

Los datos obtenidos se sometieron a dos test estadísticos según cumplieran o no criterios de normalidad. Se utilizó la t de Student como test paramétrico y la prueba de Wilcoxon no paramétrico como test no paramétrico (Mann-Whitney). El nivel de significación estadística se situó en $P < 0,05$. Las diferencias se valoran en esta Tesis como “muy significativas” (**; $P < 0,01$), “significativas” (*; $0,01 \leq p < 0,05$) o “tendencia” (†; $0,050 \leq p < 0,1$).

Se han utilizado los programas de software Microsoft Excel®, Microsoft Word® y Microsoft Power Point® para el análisis de datos y presentación de los resultados.

- ANEXOS A MATERIAL Y MÉTODOS -

ANEXO 1. Preparación de solución de inyección HRP al 20%.

- Se pesa 1mg de HRP.
- Se disuelve en 5µl de agua.
- Se introduce el tubo Eppendorf con la disolución en un sonicador y se mantiene durante el tiempo suficiente como para que se disuelva por completo.
- Se carga la disolución en una jeringa Hamilton de 10µl.

Productos utilizados:

- HRP (type VI; Sigma, St. Louis, MO)

ANEXO 2. Solución de incubación de HRP.

Se deben preparar por separado las tres siguientes soluciones:

- 1) Se diluyen 600 mg de nitroferricianuro sódico (en su defecto se puede utilizar nitroprusiato sódico) en 555 ml de agua bidestilada.
- 2) 30 ml de buffer acetato 0,2M pH 3,3, obtenido directamente del stock de este producto.
- 3) Se diluyen 30 mg de TMB en 15 ml de etanol y se introduce esta solución en un sonicador manteniéndola hasta que el TMB se ha disuelto por completo.

Las soluciones 1), 2) y 3) se vierten por este orden en una bandeja de cristal.

Productos utilizados:

- Nitroferricianuro sódico.
- Búffer acetato 0,2M pH 3,3 (Panreak)
- Etanol: CH₃CH₂OH; Pm: 46.
- TMB: 3,3'-tetrametilbenzidina (Merck)

ANEXO 3. Solución de incubación de CyO

Para un volumen estándar de 100 ml se utilizan los siguientes componentes:

- 4 g de sacarosa.
- 40 mg de citocromo C.
- 50mg de DAB (conservada en viales de 5 mg en un arcón a -80°C).
- 100 de búffer fosfato 0,1M.

Se consigue la disolución completa manteniéndola durante el tiempo necesario en un sonicador. Posteriormente se almacenará en una estufa de 37°C hasta que se desarrolle la reacción.

Productos utilizados:

- DAB: 3,3'-Diaminobenzidina tetrahidroclorada: $C_{12}H_{14}N_4 \times 4HCl$; Pm: 360,1 g/mol (Sigma).
- Citocromo C; Pm: 12,4 g/mol (Sigma).
- Sacarosa: $C_{12}H_{22}O_{11}$; Pm: 342,3 g/mol (Mikrobiologie).

ANEXO 4. Reactivos para la tinción de Nissl

Solución de Violeta de Cresilo

500ml de violeta de cresilo al 0,1% en H_2O destilada, se añaden 2,5ml de ácido acético glacial. Esta solución se filtra antes de ser utilizada.

Diferenciador (para 1 litro):

17 ml de ácido acético glacial, se enrasa a 1 litro con etanol de 96°.

Productos utilizados:

- Violeta de cresilo: $C_{17}H_4ClN_3$; Pm: 311,77 g/mol (Merck).
- Ácido acético glacial: CH_3COOH ; Pm: 60,05 g/mol (Panreac).
- Cloroformo (estabilizado con etanol purísimo): Cl_3CH ; Pm: 119,38 g/mol (Panreac).

ANEXO 5. Reactivos generales

TAMPÓN FOSFATO (PB) 0,1 M, pH 7,4

Para 1 litro:

115 ml de solución A + 385 ml de solución B + enrasar a 1 litro con H_2O destilada

- Solución A: 27,6 g de fosfato sódico monobásico se lleva a 1 litro con H_2O destilada.
- Solución B: 35,6 g de fosfato sódico dibásico se lleva a 1 litro con H_2O destilada.

Productos utilizados:

- Fosfato sódico monobásico: $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; Pm: 137,99 g/mol (Panreac).
- Fosfato sódico dibásico: $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$; Pm: 137,99 g/mol (Panreac).

SOLUCIÓN DE GELATINA PARA RECUBRIR PORTAOBJETOS

- Solución A: calentar 450 ml de H_2O destilada (50-60°C) y añadir lentamente 20 g de gelatina en polvo.
- Solución B: 0,5 g de sulfato crómico potásico + 50 ml de H_2O destilada.
- Mezclar A y B, dejar enfriar y filtrar.

Productos utilizados:

- Gelatina (Prolabo).
- Sulfato crómico potásico: $\text{CrK}(\text{SO}_4)_2 \times 12 \text{H}_2\text{O}$; Pm: 499,4 g/mol (Fisher).

4. RESULTADOS

4.1 ANATOMÍA Y PROYECCIONES DE LOS NÚCLEOS TRIGEMINALES

4.1.1 Los núcleos del trigémino: anatomía

Las características histológicas de los núcleos trigeminales han sido descritas en estudios previos (Waite y Tracey, 1995). Todos los núcleos son delimitados sin problemas en su parte lateral y convexa por el tracto trigeminal. En las regiones mediales, sin embargo, los bordes son menos precisos y la delineación se ha realizado utilizando diferentes secciones de tejido con varios marcadores así como otros recursos (Paxinos et al., 1999). La figura 1 muestra una secuencia de secciones coronales teñidas para Nissl, en la que se han marcado los límites de los diferentes subnúcleos. Estos núcleos no son homogéneos en su citoarquitectura, que muestran diferencias llamativas, sobre todo entre las regiones dorsales y ventrales del Vp, Vo y Vip. Esto ha llevado a la introducción de diferentes subdivisiones (Falls et al., 1985; Paxinos et al., 1999). La identificación de los límites rostrocaudales de cada uno de los núcleos puede en algunas ocasiones plantear dificultades. De acuerdo con otros autores (Paxinos et al., 1999), los límites entre estos núcleos están orientados oblicuamente con respecto al plano coronal de sección lo que hace que la región rostral y la caudal de núcleos vecinos coexista en la misma sección histológica. Aunque estos bordes pueden ser identificados en el tejido tratado con Nissl (figura 10), destacan más en el tejido teñido con citocromo oxidasa (figura 11). El borde medial del Vp está marcado a lo largo del eje rostrocaudal por los fascículos de la raíz motora trigeminal, entre los cuales algunos grupos celulares definen el núcleo intertrigeminal. En la región caudal hay un límite distinto entre los grupos celulares más densos del Vp y el núcleo reticular parvocelular del puente, que se sitúa como una cuña entre el Vp y la rama del facial.

La delineación del subnúcleo Vp con Nissl es más difícil de realizar en las regiones dorsales. Dorsalmente una región con escaso número de células indica la separación entre el Vp y la región ventrolateral del complejo parabraquial, incluye el núcleo de Kölliker-Fuse. Dorsomedialmente, el núcleo supratrigeminal linda con la división dorsal del Vp. Los límites mediales y ventromediales del Vo están marcados por una abundancia de fascículos mielinizados que, en parte, pertenecen a la formación reticular parvocelular pontina y en parte conectan el Vo con las fibras perifaciales del núcleo facial. El borde dorsomedial es nuevamente más difícil de delimitar ya que la citoarquitectura del Vo es variable en su mitad dorsal y además por la relativa pobreza de fibras y un patrón neuronal más complejo en la formación reticular adyacente.

En su borde dorsomedial, el Vip consiste en un grupo de pequeñas células que se combinan con la región lateral del complejo solitario. La progresiva transición entre estos dos núcleos, sin embargo, se interrumpe por un tracto delgado y pequeño de fibras mielínicas, lo que ayuda a marcar un borde. Más dorsalmente, una zona de transición reticular pobremente definida separa el Vip de la región rostral del núcleo cuneatus y del núcleo espinal vestibular (Bermejo et al., 2003).

El Vc comienza rostralmente como una zona de transición que es flanqueada lateralmente por la región caudal del Vip; se vuelve laminada según se avanza hacia la región caudal y se estrecha lentamente hasta que converge sin un claro límite con la región cervical del asta dorsal. Sólo se considerarán las capas I-IV para su medición y para la cuantificación del número de neuronas en estudio ya que pueden ser delineadas de un modo bastante preciso. Las capas más profundas (V-VI) tienen bordes más imprecisos y sólo aparecen alrededor de 1 mm caudal al límite rostral de Vc, como una prolongación del núcleo reticular dorsal del bulbo (Avendaño et al., 2005).

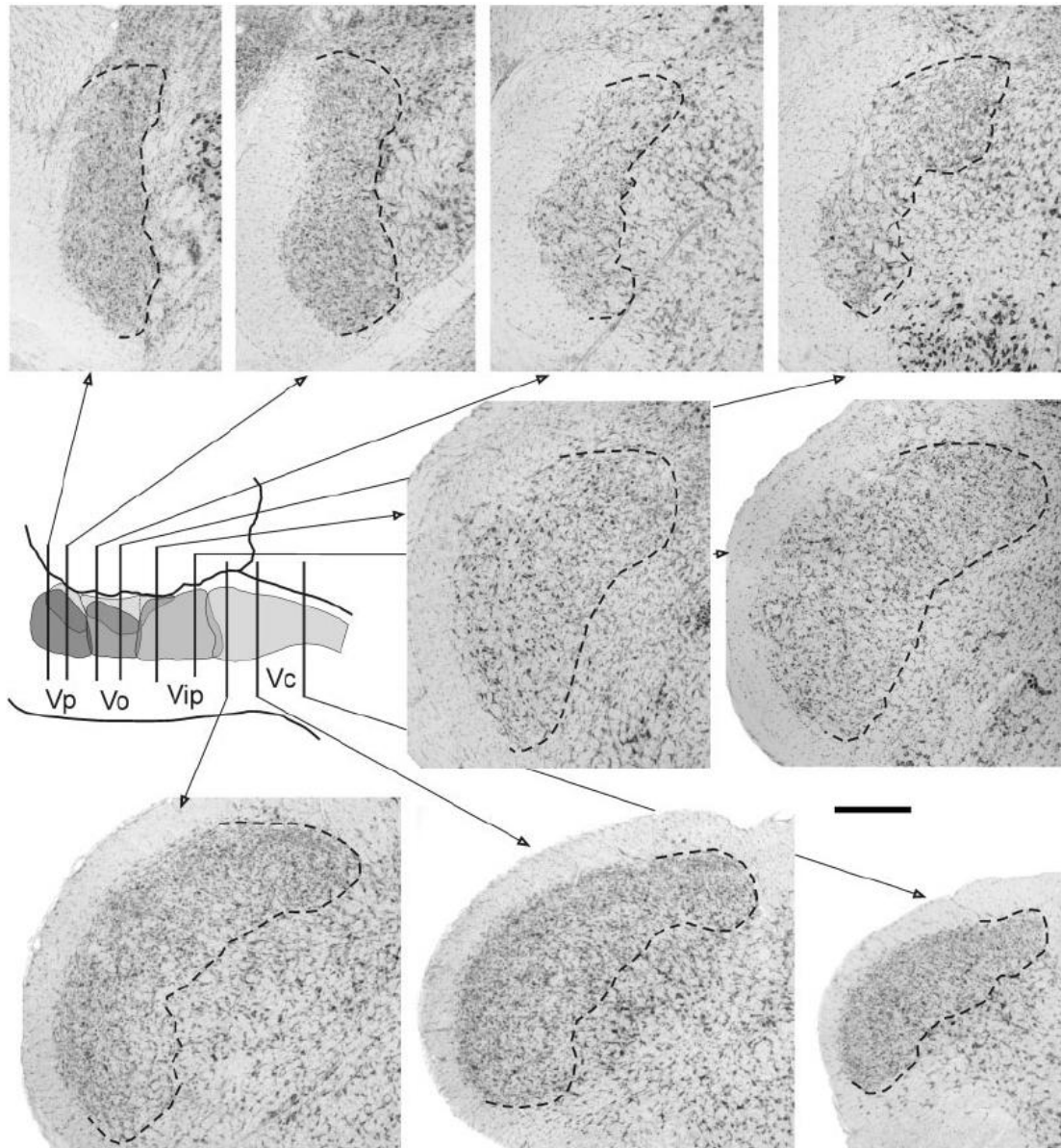


Figura 10. Microfotografías de 50 μ m de grosor, teñidas para Nissl, de secciones coronales en celoidina del cuadrante lateral del tronco del encéfalo de la rata mostrando los núcleos trigeminales. Las líneas punteadas muestran los límites de los núcleos excepto en las regiones claramente diferenciadas por el tracto trigeminal. Las diferencias citoarquitecturales entre las porciones dorsales y ventrales de Vp y de Vo son claramente visibles, aunque no permiten el establecimiento de subdivisiones. El nivel de cada sección se indica en el diagrama de la izquierda proyectados sobre una silueta del tronco del encéfalo, reconstruido según datos de Paxinos y Watson (1998). Barra de escala: 0,5mm (aplicada a todas las microfotografías).

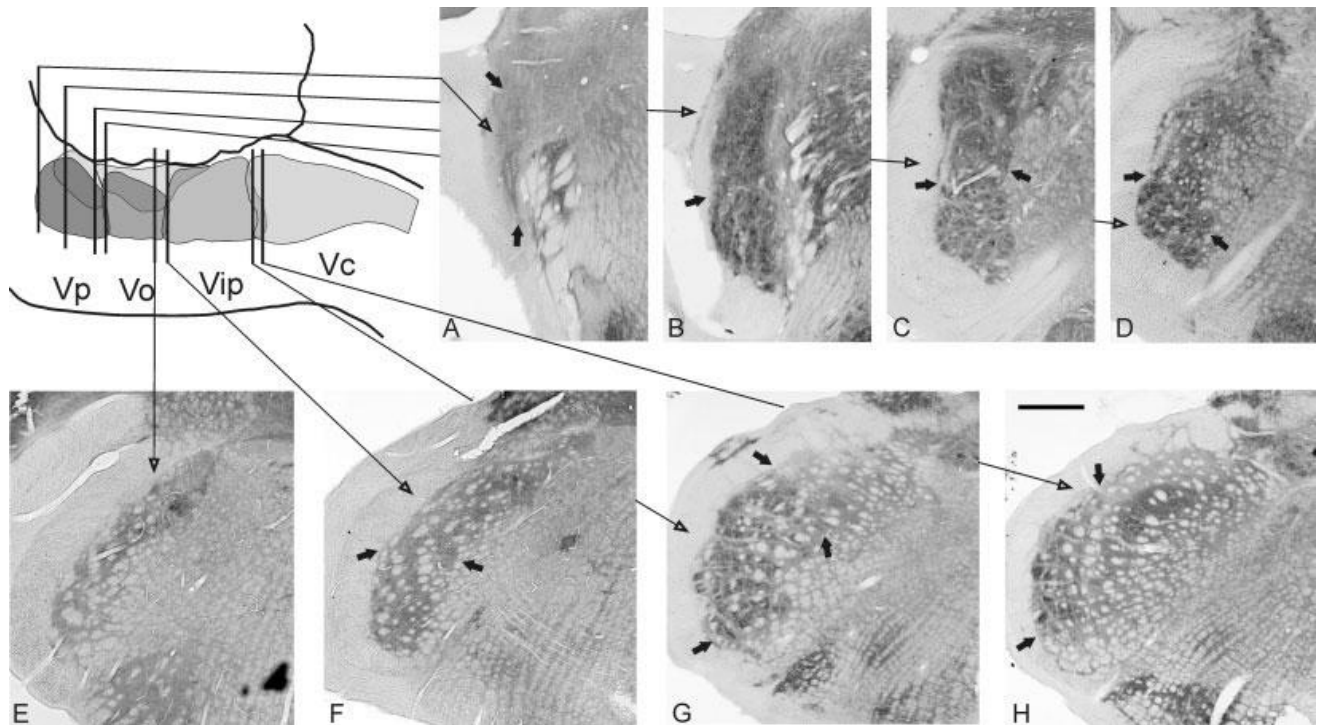


Figura 11. Microfotografías de secciones coronales teñidas con citocromo oxidasa de 40 μm de espesor de los núcleos trigeminales sensitivos en los niveles donde los límites rostrocaudales entre los núcleos son particularmente difíciles de trazar. Las flechas gruesas ayudan a delimitar el límite más rostral del núcleo (A), las divisiones dorsales y ventrales del Vp (B,C), la parte caudal del Vo (E) y su solapamiento con la extensión rostroventral del Vip (F), y el complejo solapamiento entre el Vip y el Vc al nivel del óbex (G), así como 0,25mm caudal a él (H). El diagrama de los núcleos, las abreviaturas y la barra de escala son las mismas que las de la figura 1.

4.1.2 Volumen de los diferentes núcleos del trigémino

El volumen de los núcleos sensitivos del trigémino corregidos para el encogimiento del tejido (ver Materiales y Métodos) para cada lado oscila entre 9,2 y 10,0mm³ (media 9,6; mediana 9,7) de los cuales el 40,5%, el 28,4%, el 16,7% y el 14,6% corresponden respectivamente al Vc, Vip, Vo y Vp (tabla 2). Estos porcentajes de volumen corresponden a unos volúmenes de 3,89, 2,73, 1,60 y 1,40mm³ para cada uno de estos núcleos.

La variabilidad intersujeto fue baja para el conjunto de los núcleos sensitivos trigeminales y para cada uno de ellos por separado. De esta forma el coeficiente de variación para el conjunto de los núcleos fue de 0,024, mientras que fue de 0,052, 0,028, 0,031 y 0,026 para el Vc, Vip, Vo y Vp respectivamente. La mayoría de esta variabilidad representa una variedad biológica real, dado el bajo error de muestreo obtenido (coeficiente de variación).

En el núcleo Vp se han diferenciado dos regiones diferentes en base a las diferentes tinciones aplicadas y sobre todo en las distintas proyecciones al tálamo y al cerebelo.

Los volúmenes de los diferentes núcleos del trigémino, de su suma, sus medias, coeficiente de variación y coeficiente de error están recogidos en la tabla 1 mientras que la distribución de las regiones Vp_d y Vp_v se recogen en la tabla 3.

CASO	LADO	VC	VIP	VO	VP	TOTAL
TT14	D	3,88	2,87	1,56	1,43	9,74
TT16	D	4,06	2,79	1,50	1,39	9,74
	I	3,70	2,77	1,56	1,40	9,44
TT17	D	3,75	2,59	1,60	1,36	9,30
	I	3,56	2,67	1,59	1,42	9,24
TT18	D	3,93	2,80	1,64	1,44	9,82
	I	4,03	2,76	1,63	1,44	9,87
TT19	D	4,09	2,82	1,57	1,40	9,88
	I	3,93	2,65	1,56	1,42	9,55
TT20	D	3,66	2,70	1,63	1,33	9,32
	I	3,59	2,75	1,62	1,34	9,30
TT21	D	3,70	2,73	1,59	1,37	9,40
	I	–	2,75	1,62	1,42	–
TT22	D	3,85	2,62	1,70	1,40	9,57
	I	4,13	2,59	1,69	1,39	9,80
TC1	D	4,16	2,76	1,66	1,42	10,00
	I	3,79	2,76	1,66	1,44	9,65
TC2	D	3,99	2,67	1,59	1,46	9,71
	I	4,05	2,63	1,56	1,42	9,65
TC3	D	–	2,73	1,60	1,44	–
	I	–	2,82	1,60	1,39	–
TC4	D	4,05	2,69	1,60	1,34	9,68
	I	3,68	2,75	1,62	1,36	9,40
TC5	D	4,28	2,72	1,53	1,42	9,94
	I	3,79	2,82	1,52	1,36	9,48
Media		3,89	2,73	1,60	1,40	9,61
%		40,5%	28,4%	16,7%	14,6%	100%
CV_a		0,052	0,028	0,031	0,026	0,024
CE_a		0,028	0,026	0,013	0,027	

Tabla 2. Volumen en mm³ para cada división de los núcleos sensitivos trigeminales del trigémino para un encogimiento del tejido del 30%. El símbolo “%” representa el porcentaje de cada subnúcleo sobre el volumen total de los núcleos sensitivos del trigémino. D: lado derecho; I: lado izquierdo.

CASO	LADO	VP _d	VP _v	VP TOTAL
TC1	D	0,73	0,69	1,42
	I	0,74	0,70	1,44
TC2	D	0,76	0,70	1,46
	I	0,74	0,67	1,42
TC4	D	0,70	0,64	1,34
	I	0,72	0,64	1,36
TC5	D	0,72	0,70	1,42
	I	0,70	0,66	1,36
Media		0,73	0,68	1,40
%		51,8%	48,2%	100%
CV_a		0,029	0,037	0,024
CE_a		0,036	0,036	0,027

Tabla 3. Volumen en mm³ para cada región del núcleo Vp para un encogimiento del tejido del 30%. El símbolo “%” representa el porcentaje de cada región sobre el volumen total del núcleo Vp. D: lado derecho; I: lado izquierdo. VP_d: región dorsal del Vp; VP_v: región ventral del Vp.

4.1.3 Número total de neuronas de los núcleos del trigémino

El número total de neuronas del complejo trigeminal para cada lado osciló entre 226.000 y 318.900 (media 281.000; mediana 284.800), de los cuales el 58,5%, el 21,7%, el 7,5% y el 12,6% correspondieron respectivamente al Vc, Vip, Vo y el Vp (tabla 4). La variabilidad entre los sujetos fue discreta (CV entre 0,07 y 0,12) y la precisión de las estimaciones fue alta (bajo coeficiente de error) para todos los núcleos. El número medio de neuronas (en miles) del lado derecho fue de $283,8 \pm 25,2$, ligeramente mayor que en el lado izquierdo, que fue de $278,1 \pm 18,4$, aunque esta diferencia no fue significativa.

La densidad neuronal media difiere sustancialmente para los distintos núcleos y estas diferencias se basan tanto en el tamaño celular como en la distribución de las neuronas, lo cual puede ser apreciado a simple inspección. La menor densidad neuronal corresponde al Vo (13,300 neuronas/mm³, corregido para un encogimiento de volumen del 30%) y la mayor al Vc (42,300 neuronas/mm³). Los núcleos Vip y Vp tienen densidades similares con 22,300 neuronas/mm³ para el primero y 25,200 neuronas/mm³ para el segundo.

CASO	LADO	VC	VIP	VO	VP	TOTAL
TC-1	D	208,3	57,3	21,3	36,8	318,7
	I	155,5	52,8	18,7	37,5	260,6
TC-2	D	188,6	65,5	23,8	41,0	318,9
	I	192,1	63,3	23,2	37,6	316,2
TC-3	D	–	48,9	24,7	38,6	–
	I	–	60,6	22,6	33,7	–
TC-4	D	164,5	49,2	24,1	38,2	271,9
	I	185,9	56,4	20,3	33,6	292,3
TC-5	D	118,9	62,3	19,8	29,1	226,0
	I	134,5	66,6	19,1	31,6	247,8
TT16	D	160,1	67,3	20,9	36,4	284,7
	I	174,4	60,7	19,7	35,3	290,1
TT17	D	165,8	64,8	20,0	34,3	284,9
	I	157,8	67,7	24,5	32,7	282,7
TT18	D	182,6	52,5	19,9	35,1	290,1
	I	162,6	54,0	20,6	37,7	274,9
TT19	D	171,1	59,2	22,6	34,7	287,6
	I	153,3	58,2	21,0	37,0	269,5
TT20	D	165,5	69,0	20,3	36,0	290,8
	I	169,0	62,0	20,6	36,0	287,6
TT21	D	147,7	66,3	20,1	32,3	266,4
	I	144,9	66,3	21,6	33,4	266,2
TT22	D	160,5	66,8	19,7	34,7	281,7
	I	154,6	62,8	20,1	34,0	271,5
	Media	164,5	60,8	21,2	35,3	281,0
	%	58,5%	21,7%	7,5%	12,6%	100%
	CV	0,12	0,10	0,08	0,07	0,08
	CE	0,073	0,072	0,081	0,063	

Tabla 4. Número total de neuronas (en miles) en cada núcleo del trigémino. El símbolo “%” representa el porcentaje de cada núcleo sobre el complejo trigeminal. D: lado derecho; I: lado izquierdo.

4.1.4 Proyecciones al tálamo de los diferentes núcleos del trigémino

Las neuronas marcadas con HRP fueron fácilmente distinguidas de aquellas que únicamente estaban teñidas con Nissl. La figura 12 muestra la diferencia entre los dos tipos de neuronas que se cuantificaron (marcadas con HRP frente a las teñidas con Nissl) mientras que la figura 13 muestra una panorámica del tejido cuantificado en la que se distinguen tanto neuronas marcadas como no marcadas.

El número medio de neuronas trigeminales que proyectan al tálamo es de 33.400 por cada lado, con un rango entre 30.300 y 37.300, lo que supone un 11,9% del total de neuronas existentes en el complejo trigeminal. El mayor porcentaje de proyección talámica de todos los núcleos trigeminales se encuentra en el Vp (18.400 neuronas, 52,6%) mientras que el menor se localiza en el Vc (2.600 neuronas, 1,6%). El Vip y el Vo adquieren porcentajes de proyección intermedios: 16,7% para el primero y 9,5% para el segundo. Según estos resultados, la mayor proyección al tálamo desde los núcleos del trigémino se realiza desde el Vp con un 55,1% de la proyección trigeminotalámica, seguido del Vip con el 31,1%, el Vc con el 7,8% y el Vo con sólo en 6,0%.

El número de neuronas de proyección al tálamo en el lado derecho fue de 33.600 ± 2.400 mientras que en el lado izquierdo fue de 33.200 ± 1.400 , sin que existiese diferencia significativa entre ambos lados. El porcentaje de neuronas de proyección talámica para el total de neuronas trigeminales fue de $11,9 \pm 0,7\%$ para el lado derecho frente a $11,8 \pm 0,7\%$ para el lado izquierdo. En este caso, la diferencia tampoco fue estadísticamente significativa.

El número de neuronas de proyección talámica para cada uno de los diferentes núcleos del trigémino, su suma, sus medias, su coeficiente de variación y su coeficiente de error están recogidos en la tabla 5.

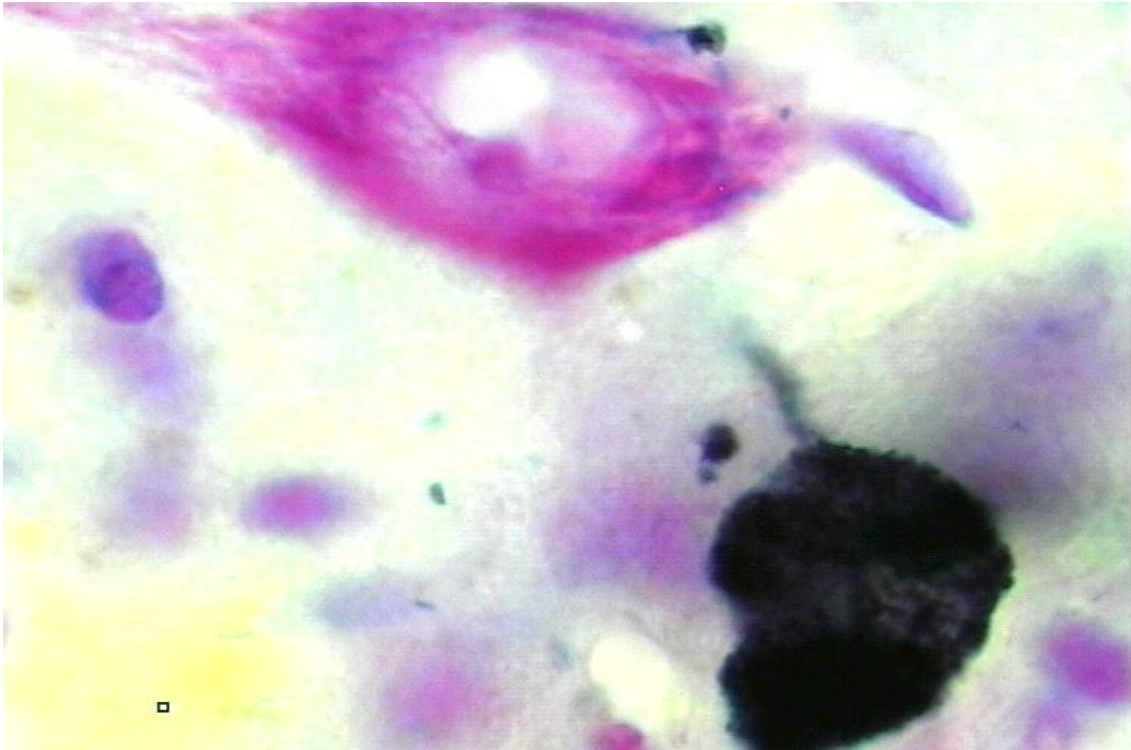


Figura 12. Diferencias entre las neuronas marcadas con HRP y las teñidas con Nissl.

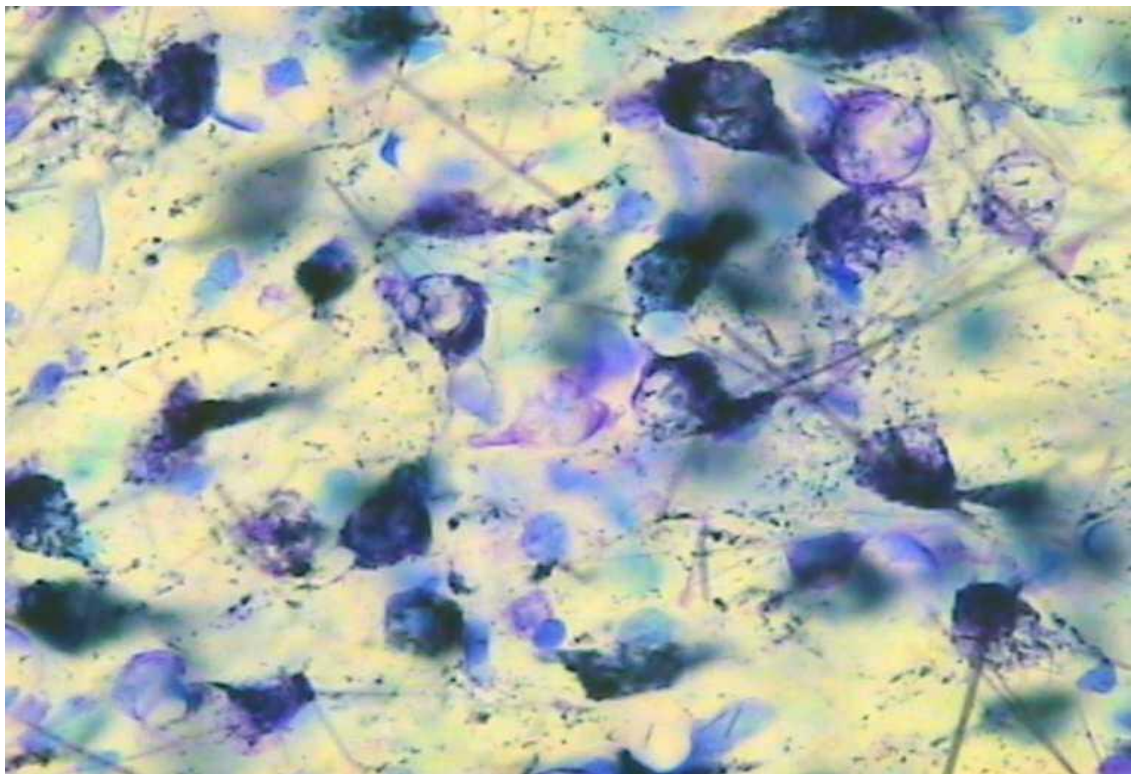


Figura 13. Panorámica del Vp.

		VC				VIP				VO				VP				Total			
		HRP+	HRP-	TOTAL	%	HRP+	HRP-	TOTAL	%	HRP+	HRP-	TOTAL	%	HRP+	HRP-	TOTAL	%	HRP+	HRP-	TOTAL	%
TT16	D	2,1	158,0	160,1	1,3%	10,9	56,4	67,3	16,2%	2,5	18,4	20,9	11,9%	19,1	17,3	36,4	52,5%	34,6	250,1	284,7	12,2%
	I	2,8	171,6	174,4	1,6%	10,4	50,3	60,7	17,1%	1,5	18,2	19,7	7,1%	18,6	16,7	35,3	52,7%	33,3	256,8	290,1	11,5%
TT17	D	1,2	164,6	165,8	0,7%	11,1	53,6	64,8	17,2%	0,6	19,4	20,0	3,1%	17,3	17,0	34,3	50,4%	30,3	254,6	284,9	10,6%
	I	0,6	157,2	157,8	0,4%	12,8	54,9	67,7	18,9%	2,3	22,3	24,5	9,2%	18,8	13,9	32,7	57,5%	34,5	248,2	282,7	12,2%
TT18	D	4,3	178,4	182,6	2,3%	10,0	42,5	52,5	19,1%	3,4	16,4	19,9	17,3%	19,6	15,5	35,1	55,8%	37,3	252,8	290,1	12,8%
	I	3,6	159,0	162,6	2,2%	9,1	44,9	54,0	16,8%	2,3	18,3	20,6	11,1%	19,3	18,4	37,7	51,3%	34,3	240,6	274,9	12,4%
TT19	D	2,9	168,2	171,1	1,7%	10,9	48,3	59,2	18,4%	2,7	19,9	22,6	11,9%	17,8	16,9	34,7	51,3%	34,3	253,3	287,6	11,9%
	I	2,0	151,3	153,3	1,3%	9,5	48,7	58,2	16,3%	3,1	17,9	21,0	14,7%	19,9	17,1	37,0	53,8%	34,5	235,0	269,5	12,8%
TT20	D	3,5	162,0	165,5	2,1%	9,9	59,1	69,0	14,3%	0,9	19,4	20,3	4,3%	18,9	17,1	36,0	52,6%	33,1	257,6	290,8	11,4%
	I	1,4	167,6	169,0	0,8%	9,3	52,7	62,0	14,9%	2,9	17,7	20,6	14,1%	17,5	18,6	36,0	48,4%	31,0	256,6	287,6	10,7%
TT21	D	3,1	144,6	147,7	2,1%	9,9	56,4	66,3	14,9%	1,2	18,9	20,1	5,9%	16,9	15,4	32,3	52,3%	31,1	235,3	266,4	11,6%
	I	3,7	141,2	144,9	2,5%	9,6	56,7	66,3	14,5%	1,6	20,0	21,6	7,4%	16,7	16,7	33,4	50,0%	31,6	234,6	266,2	11,8%
TT22	D	2,9	157,6	160,5	1,8%	11,8	55,0	66,8	17,7%	1,1	18,6	19,7	5,6%	18,9	15,8	34,7	54,57%	34,7	247,0	281,7	12,3%
	I	2,1	152,5	154,6	1,4%	10,9	51,9	62,8	17,4%	1,8	18,3	20,1	8,9%	18,1	15,9	34,0	53,2%	32,9	238,6	271,5	12,1%
Media		2,6	159,6	162,1	1,6%	10,4	52,2	62,7	16,7%	2,0	18,8	20,8	9,5%	18,4	16,6	35,0	52,6%	33,4	247,2	280,6	11,9%
CV_a		0,41	0,06	0,06	0,40	0,10	0,09	0,08	0,09	0,44	0,07	0,06	0,44	0,06	0,07	0,04	0,04	0,06	0,04	0,03	0,06
\overline{CE}		0,13				0,15				0,19				0,17							

Tabla 5. Neuronas trigeminotalámicas. Número total de neuronas para cada núcleo del complejo trigeminal (en miles) y porcentaje de neuronas marcadas (con proyección al tálamo). HRP+: neuronas marcadas con HRP; HRP-: neuronas no marcadas con NRP; %: porcentaje de neuronas marcadas con HRP sobre el total; D: lado derecho; I: lado izquierdo. \overline{CE} representa el valor medio de los CE obtenido mediante la estimación de cada animal $\overline{CE} = (\sum CE_i^2)^{1/2} \cdot n^{-1}$.

4.1.5 Proyecciones al cerebelo de los diferentes núcleos del trigémino

El número medio de neuronas trigeminales que proyectan al cerebelo es de 7.200 por cada lado, con un rango entre 5.200 y 9.700, lo que supone un 2,53% del total de neuronas existentes en el complejo trigeminal. El mayor porcentaje de proyección cerebelosa de los núcleos trigeminales se encuentra en el Vp (2.300 neuronas; 6,3%) y en el Vip (3.600 neuronas; 6,4%) mientras que la proyección es moderada en el Vo (900 neuronas; 4,3%) y escasa en el Vc (800 neuronas; 0,5%).

Según estos resultados, la mayor proyección al cerebelo desde los núcleos del trigémino se realiza mediante el Vip con el 47,4% de la proyección trigeminocerebelosa, seguido del Vp con el 30,3%, el Vo con el 11,8% y el Vc con sólo en 10,5%.

El número de neuronas de proyección al cerebelo en el lado derecho fue de 6.900 ± 1.900 mientras que en el lado izquierdo fue de 7.400 ± 1.800 , sin que existiese diferencia significativa entre ambos lados. El porcentaje de neuronas de proyección cerebelosa para el total de neuronas trigeminales fue de $2,4 \pm 0,4\%$ para el lado derecho frente a $2,6 \pm 0,4\%$ para el lado izquierdo. En este caso, la diferencia tampoco fue estadísticamente significativa.

En el Vp, las neuronas de proyección trigeminocerebelosas se localizan fundamentalmente en el área dorsal (Vp_d) donde se encuentra el 84,0% de la proyección de este núcleo al cerebelo y el porcentaje de neuronas de proyección cerebelosa alcanza el 11,3%. Por su parte, la región ventral (Vp_v) únicamente representa el 16,0% de la proyección cerebelosa del Vp y sólo el 2,2% de sus neuronas proyectan al cerebelo.

Las figuras 14 y 15 muestran el núcleo Vp y las diferencias de proyección cerebelosa entre el Vp_d y el Vp_v . La figura 15 muestra una panorámica de los diferentes núcleos del trigémino con las neuronas trigeminotalámicas y las trigeminocerebelosas marcadas. Las figuras 16 y 17 muestran un esquema de la proyección trigeminotalámica y trigeminocerebelosa.

El número de neuronas de proyección cerebelosa para cada uno de los diferentes núcleos del trigémino, su suma, sus medias, su coeficiente de variación y su coeficiente de error están recogidos en la tabla 6. Por su parte, la tabla 7 muestra las neuronas de proyección cerebelosa de la Vp_d y de la Vp_v .

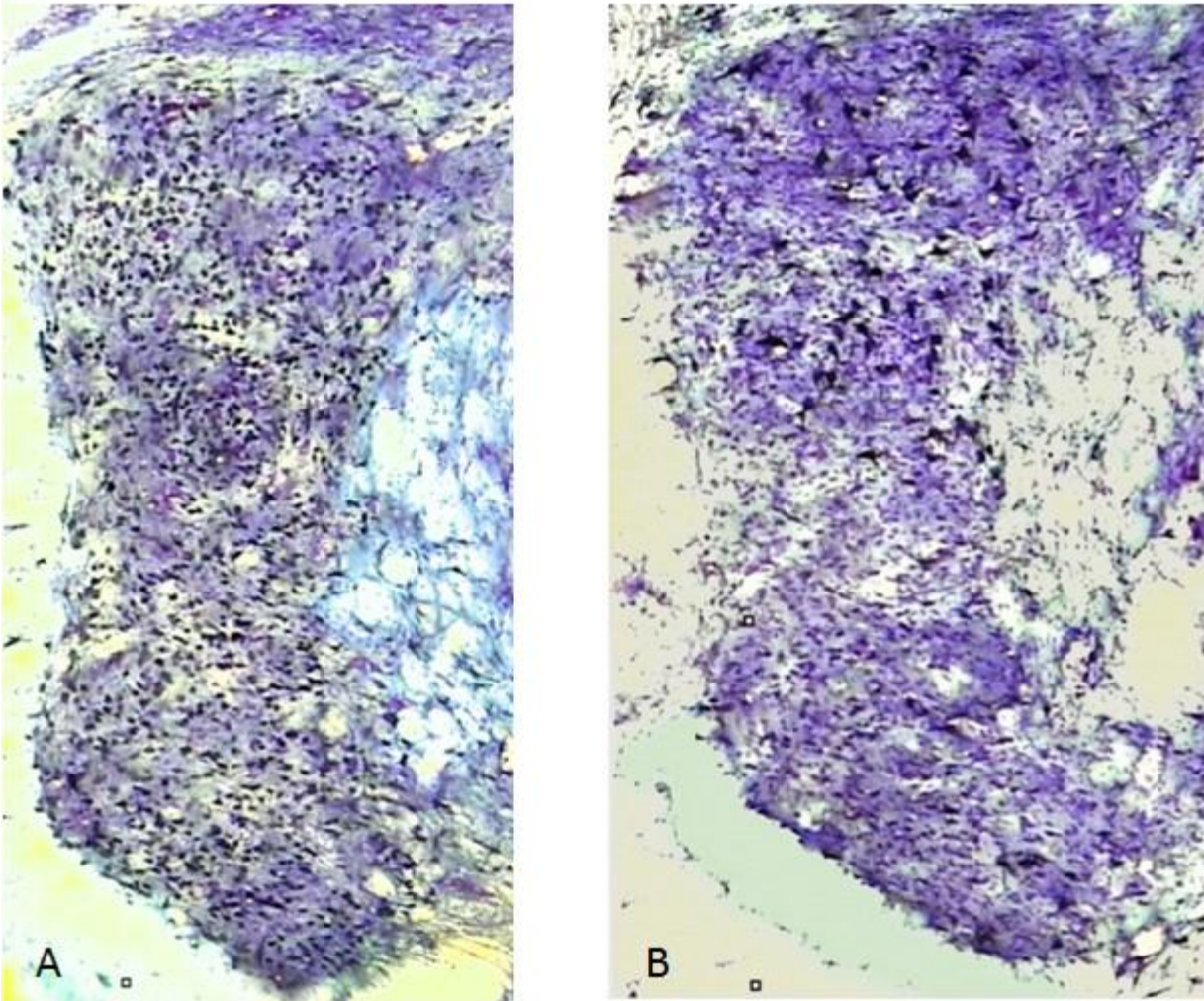


Figura 5. La figura A corresponde a la proyección trigeminotalámica del Vp en la que se aprecia que dicha proyección es homogénea en las diferentes regiones del núcleo. Por su parte, en la figura B, que corresponde a la proyección trigémicocerebelosa del Vp se observa que las neuronas que proyectan al cerebelo se localizan preferentemente en la Vp_d y, por lo general, son de mayor tamaño.

		Vc				Vip				Vo				Vp				Total			
		HRP+	HRP-	Total	%	HRP+	HRP-	Total	%	HRP+	HRP-	Total	%	HRP+	HRP-	Total	%	HRP+	HRP-	Total	%
TC1	D	1,0	154,50	155,5	0,67%	3,7	47,0	50,7	7,30%	0,9	17,8	18,7	4,81%	2,5	35,1	37,5	6,58%	9,6	251,0	260,6	3,09%
	I	2,1	206,2	208,3	1,00%	3,2	51,0	57,3	5,67%	1,1	20,2	21,3	5,16%	3,3	33,5	36,8	8,96%	9,7	310,9	323,7	3,01%
TC2	D	0,9	191,2	192,1	0,47%	2,8	60,5	63,3	4,42%	0,7	22,5	23,2	3,02%	2,7	34,9	37,6	7,18%	7,1	309,1	316,2	2,25%
	I	0,7	187,9	188,6	0,37%	3,1	62,4	65,5	4,73%	0,4	23,4	23,8	1,68%	2,4	38,6	41,0	5,85%	6,6	312,3	318,9	2,07%
TC3	D	–	–	–	–	3,4	57,1	60,6	5,68%	0,34	22,25	22,6	1,52%	2,4	31,3	33,7	7,15%	–	–	–	–
	I	–	–	–	–	3,1	45,8	48,9	6,34%	1,5	23,1	24,7	6,28%	2,8	35,8	38,6	7,25%	–	–	–	–
TC4	D	0,6	185,3	185,9	0,34%	3,4	53,1	56,4	6,02%	0,8	19,5	20,3	3,94%	1,3	32,3	33,6	3,79%	5,7	286,5	292,3	2,06%
	I	1,3	163,2	164,5	0,77%	3,4	45,8	49,2	6,90%	0,8	23,3	24,1	3,37%	2,8	35,4	38,2	7,33%	7,7	264,2	271,9	3,00%
TC5	D	0,4	134,5	134,9	0,30%	2,2	64,4	66,6	3,23%	1,2	17,9	19,1	6,43%	1,8	29,8	31,6	5,68%	5,2	242,6	247,8	2,21%
	I	0,5	118,9	119,4	0,42%	2,9	59,4	62,3	4,61%	1,4	18,4	19,8	7,10%	1,1	28,0	29,1	3,70%	5,4	220,7	226,0	2,54%
Media		0,8	167,7	168,5	0,5%	3,6	54,7	58,3	6,4%	0,9	20,8	21,8	4,3%	2,3	33,5	35,8	6,3%	7,5	276,7	284,2	2,53%
CV		0,58	0,18	0,18	0,46	0,14	0,13	0,11	0,23	0,43	0,11	0,10	0,45	0,31	0,09	0,10	0,26	0,20	0,12	0,12	0,18
\overline{CE}				0,12			0,11					0,12			0,09						

Tabla 6. Cuantificación de neuronas trigeminocerebelosas. Número total de neuronas para cada núcleo del complejo trigeminal (en miles) y porcentaje de neuronas marcadas (con proyección al cerebelo). HRP+: neuronas marcadas con HRP; HRP-: neuronas no marcadas con HRP; %: porcentaje de neuronas marcadas con HRP; D: lado derecho; I: lado izquierdo. \overline{CE} representa el valor medio de los CE obtenido mediante la estimación de cada animal $\overline{CE} = (\sum CE_i^2)^{1/2} \cdot n^{-1}$.

		VP_d				VP_v				VP-TOTAL			
		HRP+	HRP-	TOTAL	%	HRP+	HRP-	TOTAL	%	HRP+	HRP-	TOTAL	%
TC1	D	2,5	18,0	20,50	13,8%	0,8	15,8	16,60	5,06%	3,3	33,8	37,1	9,5%
	I	1,9	18,9	20,80	10,1%	0,6	16,2	16,80	3,70%	2,5	35,1	37,6	6,9%
TC2	D	2,0	20,1	22,10	9,9%	0,4	18,5	18,90	2,16%	2,4	38,6	41,0	6,1%
	I	2,4	16,3	18,70	14,7%	0,3	18,6	18,90	1,61%	2,7	34,9	37,6	8,2%
TC3	D	2,5	17,7	20,20	14,1%	0,3	18,1	18,40	1,66%	2,8	35,8	38,6	7,9%
	I	2,1	15,7	17,80	13,3%	0,3	15,6	15,90	1,92%	2,4	31,3	33,7	7,6%
TC4	D	2,2	18,0	20,20	12,2%	0,6	17,4	18,00	3,45%	2,8	35,4	38,2	7,8%
	I	1,3	16,1	17,40	8,0%	0,0	16,2	16,20	0,00%	1,3	32,3	33,6	4,0%
TC5	D	1,4	14,29	15,72	10,0%	0,4	15,4	15,72	2,33%	1,8	29,6	31,4	6,2%
	I	1,1	15,0	16,07	7,1%	0,0	12,9	12,86	0,00%	1,1	27,9	28,9	3,6%
Media		1,94	17,01	18,95	11,3%	0,37	16,46	16,83	2,2%	2,31	33,47	35,78	6,8%
CV		0,26	0,11	0,11	0,23	0,69	0,11	0,11	0,72	0,31	0,10	0,10	0,27
\overline{CE}				0,14				0,13				0,09	

Tabla 7. Número total de neuronas en Vp_d y Vp_v y porcentaje de neuronas marcadas (con proyección al cerebelo). HRP+: neuronas marcadas con HRP (trigeminotalámicas); HRP-: neuronas no marcadas con NRP; %: porcentaje de neuronas marcadas con HRP; D: lado derecho; I: lado izquierdo. \overline{CE} representa el valor medio de los CE obtenido mediante la estimación de cada animal $\overline{CE} = (\sum CE_i^2)^{1/2} \cdot n^{-1}$.

El número de neuronas de proyección al cerebelo en Vp_d fue de 1.940±510 mientras que en la Vp_v fue de 370±250, existiendo una diferencia estadísticamente significativa entre ambas regiones (P<0,001). El porcentaje de neuronas de proyección cerebelosa para el total de neuronas trigeminales fue de 11,3±2,7% para Vp_d frente a 2,2±1,5% para la Vp_v. En este caso, la diferencia también fue estadísticamente significativa para una P<0,001.

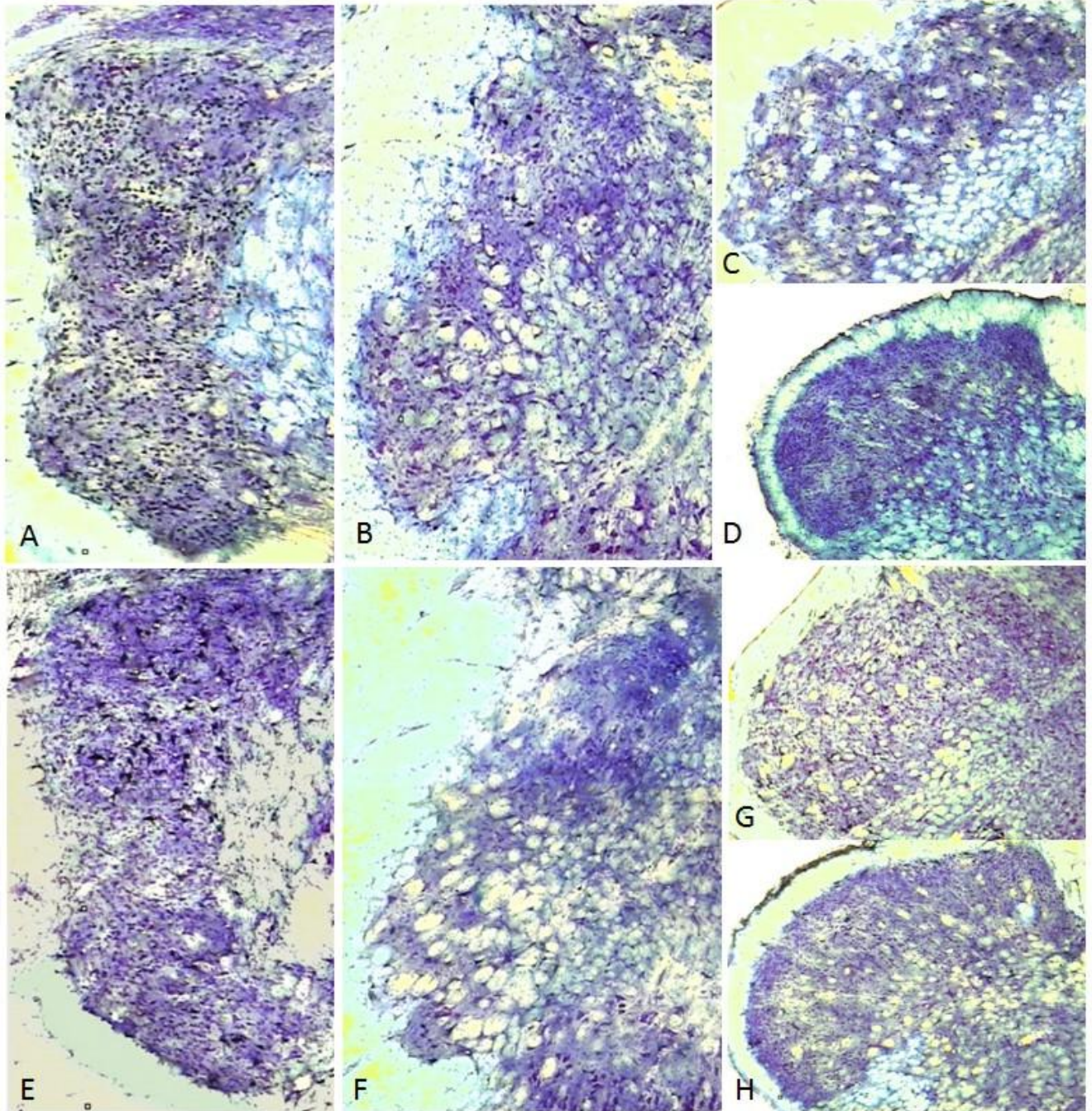


Figura 15. Esquema de las proyecciones trigeminotalámicas: A) Vp, B) Vo, C) Vip, D) Vc y trigeminocerebelosas: E) Vp, F) Vo, G) Vip y H) Vc.

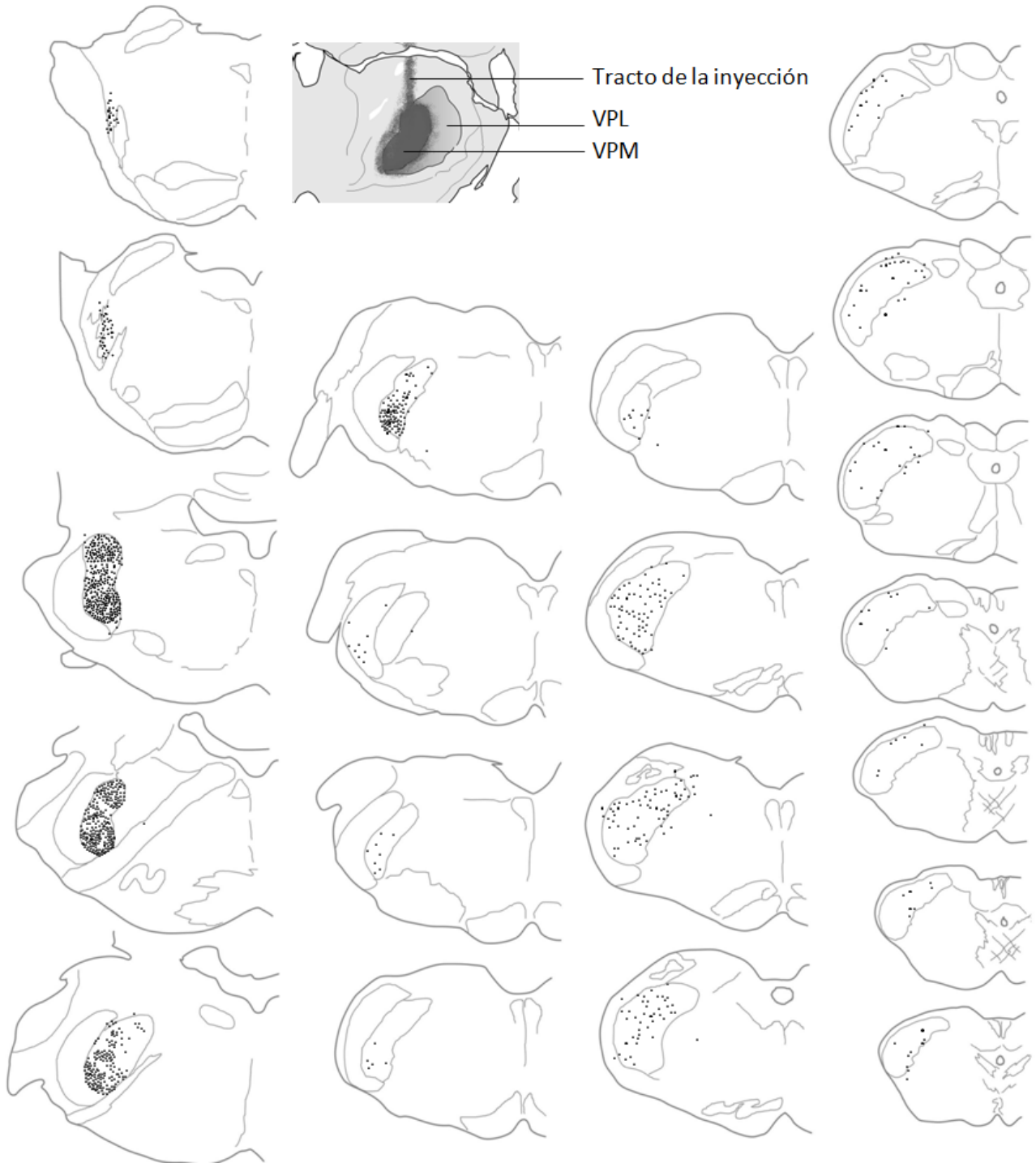


Figura 16. Esquema proyección trigeminotalámica.

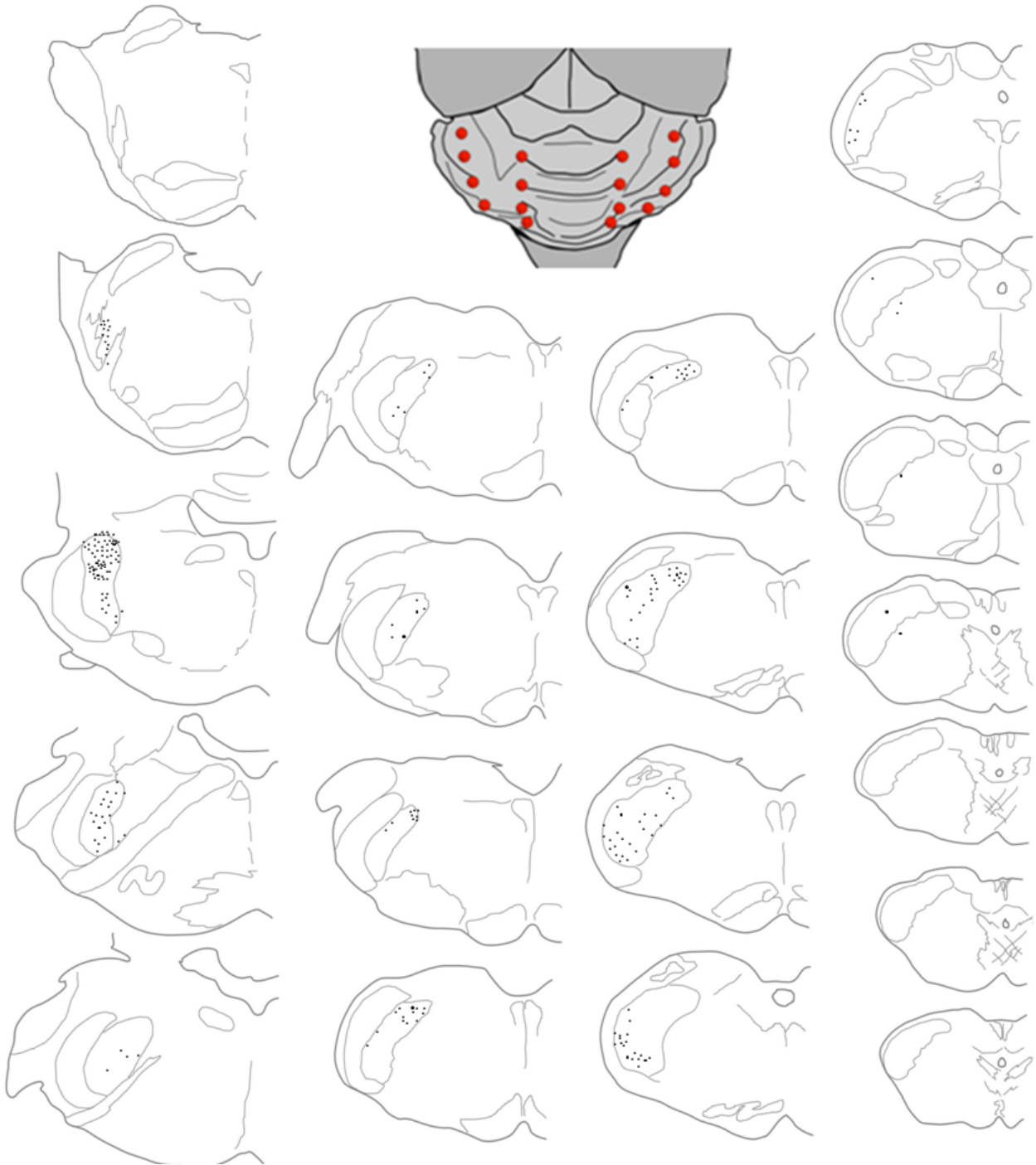


Figura 17. Esquema de la proyección trigeminocerebelosa.

4.2 LAS NEURONAS INHIBITORIAS GABAÉRGICAS Y GLICINÉRGICAS

4.2.1 Neuronas gabaérgicas y glicinérgicas en el complejo trigeminal

Un subgrupo de somas neuronales en todos los núcleos del trigémino expresan inmunorreactividad para GABA y/o glicina. Para ambos marcadores existe un rango continuo de tinción citoplásmica y nuclear, que va desde marcado débil a muy fuerte. El marcado fue considerado como fuerte cuando el citoplasma era claramente más oscuro que los perfiles de las neuronas no marcadas u otros somas celulares o dendritas. Generalmente la intensidad del marcado nuclear era similar a la del citoplasma aunque ocasionalmente aparecía levemente más teñido (sobre todo en las neuronas gabaérgicas) o menos (fundamentalmente en las neuronas glicinérgicas). Por su parte, el marcado fue considerado como débil cuando el citoplasma aparecía ligeramente más oscuro que las neuronas no marcadas y el núcleo con un tono similar o ligeramente más débil. En caso de duda, las neuronas fueron clasificadas como débiles. La Figura 18 muestra un ejemplo de neurona fuertemente marcada frente a una débilmente marcada para GABA.

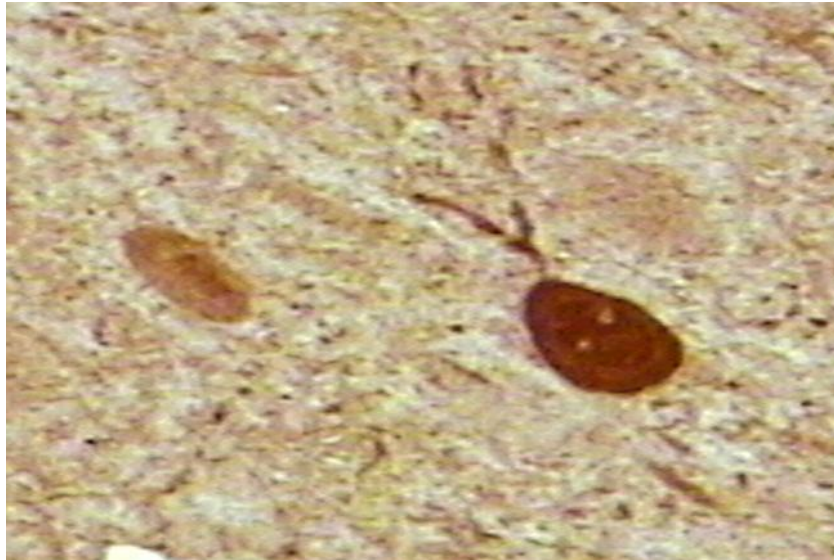


Figura 18. Neurona fuertemente marcada frente a neurona débilmente marcada para GABA en la corteza cerebral somatosensorial primaria.

El aspecto general de la distribución de las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas concuerda con las descripciones anteriormente realizadas (Ottersen y Storm-Mathisen, 1984; Ginestal y Matute, 1993). La mayoría de las células, sobre todo aquellas fuertemente marcadas, mostraban un pericarion de pequeño tamaño, con forma esferoidea u ovoide y eran más abundantes en las capas I y II del Vc. Muchas neuronas glicinérgicas eran similares en tamaño y forma en el Vp y en las capas más superficiales del Vip y del Vc. Otras células más grandes y polimórficas estaban presentes también en estas regiones aunque dominaban en las capas más profundas del Vip y del Vc.

Las figuras 19 y 20 muestran la distribución de la inmunorreactividad para estos dos neurotransmisores en el núcleo del trigémino y en la corteza cerebral.

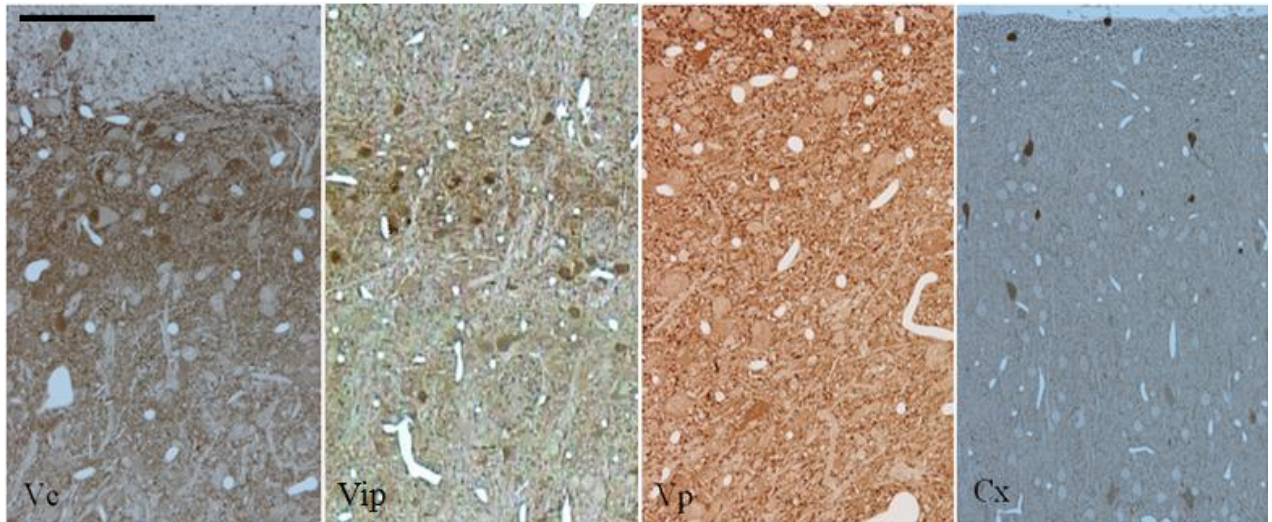


Figura 19. Panorámicas de los núcleos Vc, Vip, Vp y CxSS expresando las neuronas gabaérgicas. Barra de escala = 100 μ m (aplicado a todas las microfotografías).

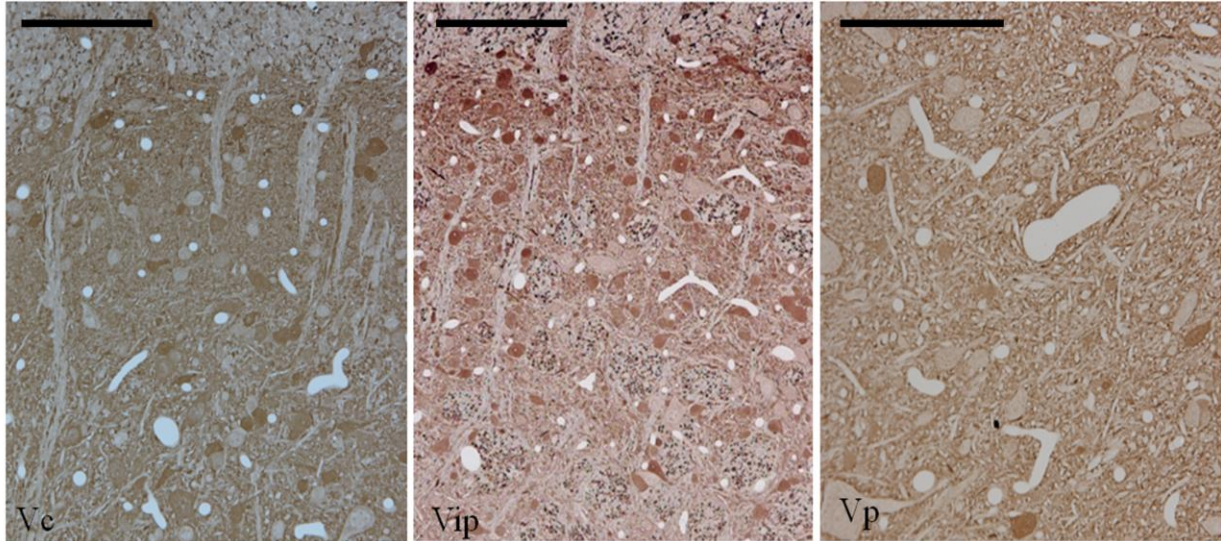


Figura 20. Panorámicas de los núcleos Vc, Vip, Vp expresando las neuronas glicinérgicas. Barra de escala = 100 μ m (aplicado a todas las microfotografías).

La densidad numérica de las células que expresan GABA y/o glicina se representa en las tablas 8 a 11. La mayor densidad de neuronas gabaérgicas se encuentra en el Vc, concretamente en su región caudal, con un claro gradiente rostrocaudal creciente. Menores densidades de neuronas gabaérgicas se encontraron en el Vip y, sobre todo, en el Vp. En el caso de este último núcleo, este es cierto únicamente para las neuronas fuertemente marcadas, ya que existe una población de células débilmente marcadas que es muy numerosa con una prevalencia aproximadamente 6 veces superior a las neuronas fuertemente marcadas para GABA. Tras la corrección para el encogimiento del tejido (ver Materiales y Métodos), el número medio de neuronas fuertemente marcadas osciló entre 960 para el Vp y 23.890 para el Vc, pasando por 8.340 para el Vip. Estos números suponen un 2,7%, el 14,5% y el 13,7% respectivamente del número total de neuronas de los núcleos trigeminales. Por su lado el número total de neuronas gabaérgicas (tanto las fuerte como las débilmente marcadas) tras la corrección para el encogimiento del tejido fue de 35.460 para el Vc, 15.950 para el Vip y de 10.220 para el Vp, lo que supone un 21,56%, un 26,23% y un 28,95% respectivamente del número total de neuronas para cada uno de los diferentes núcleos trigeminales. Estos datos quedan recogidos en la tabla 8.

		Vc			Vip			Vp			CxSS		
		Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total
UPC3	D	11,67	4,85	16,52	3,5	3,2	6,7	0,96	8,05	9,01	3,32	1,76	5,08
	I	-	-	-	3,2	3,2	6,4	1,10	9,13	10,23	3,78	2,64	6,42
UPC4	D	6,54	2,65	9,19	-	-	-	0,75	7,36	8,11	2,51	2,62	5,13
	I	6,65	3,18	9,83	3,7	3,1	6,8	0,93	7,20	8,13	3,33	1,85	5,18
UPC5	D	7,29	3,61	10,90	-	-	-	0,56	7,42	7,98	3,35	2,47	5,82
	I	6,10	3,51	9,61	-	-	-	0,79	7,26	8,05	3,33	2,17	5,50
UPC6	D	6,52	2,50	9,02	-	-	-	0,62	6,53	7,15	3,09	2,41	5,50
	I	5,82	3,49	9,31	-	-	-	0,82	7,64	8,46	3,70	1,52	5,22
UPC7	D	5,65	2,76	8,41	-	-	-	0,91	8,29	9,20	3,55	2,09	5,64
	I	7,08	4,10	11,18	-	-	-	0,65	8,35	9,00	3,35	1,96	5,31
UPC8	D	8,04	4,02	12,06	-	-	-	0,75	6,50	7,25	2,97	3,11	6,08
	I	7,42	2,54	7,96	-	-	-	0,56	6,49	7,05	2,68	2,59	5,27
	Media_a	6,98	3,38	10,37	3,47	3,17	6,63	0,78	7,52	8,30	3,25	2,27	5,51
est N_v	CV_a	0,33	0,23	0,30	0,073	0,018	0,031	0,24	0,10	0,11	0,13	0,16	0,10
	CE_a	0,013	0,024		0,020	0,040		0,066	0,022		0,012	0,021	
	est N_b	23,89	11,57	35,46	8,34	7,61	15,95	0,96	9,26	10,22			

Tabla 8. Estimación de las neuronas gabaérgicas en los núcleos sensoriales del trigémino y en la CxSS. Densidad numérica (N_v, en miles/mm³) y número total de neuronas (N, en miles). No corregido_a, y corregido_b, para el encogimiento del tejido.

La mayor densidad de neuronas glicinérgicas se encuentra nuevamente en el Vc, y más concretamente en su región caudal, aunque a diferencia de lo que sucede con las neuronas gabaérgicas, no se objetiva un claro gradiente rostrocaudal. Las neuronas glicinérgicas fueron más numerosas que las gabaérgicas en todos los núcleos, incluyendo los diferentes niveles del Vc, con una densidad más homogénea entre ellos. Además las neuronas fuertemente marcadas fueron entre 1,5 y 3 veces más que las neuronas débilmente marcadas en todos los núcleos incluyendo el Vp. Las menores densidades de neuronas glicinérgicas se encontraron en el Vp, tanto para las neuronas fuertemente marcadas como para las que lo hacían de un modo más débil. Tras la corrección para el encogimiento del tejido (ver Materiales y Métodos), el número medio de neuronas fuertemente marcadas osciló entre 9.610 para el Vp y 36.970 para el Vc, pasando por 25.220 para el Vip. Estos números suponen el 22,5%, el 41,5% y el 27,2% respectivamente del número total de neuronas de los núcleos trigeminales. Por su lado el número total de neuronas glicinérgicas (tanto las fuerte como las débilmente marcadas) tras la corrección para el encogimiento del tejido fue de 49.630 para el Vc, 36.510 para el Vip y de 15.640 para el Vp, lo que supone un 30,2%, un 60,0% y un 44,3% respectivamente del número total de neuronas para cada uno de los diferentes núcleos trigeminales. La estimación del número de neuronas glicinérgicas en los núcleos sensoriales del trigémino queda recogida en la tabla 9.

La comparativa entre las regiones caudal, intermedia y rostral del núcleo Vc mostró una clara mayor presencia de neuronas gabaérgicas en la región caudal del mismo con una densidad neuronas más del doble de la existente en las regiones más rostrales, tanto para las neuronas fuerte como para las débilmente marcadas. Antes de la corrección para el encogimiento del tejido la densidad de neuronas fuertemente marcadas fue de 11.190 células / mm³ para las regiones más caudales del núcleo y tan solo de 4.680 células / mm³ para las regiones más rostrales, con una densidad intermedia de 7.180 neuronas / mm³ para las regiones intermedias. El número total de neuronas gabaérgicas también sigue un gradiente similar siendo la densidad neuronal de 16.130 células / mm³ para las regiones más caudales del núcleo, de 10.630 neuronas / mm³ para las regiones intermedias y de 7.180 neuronas / mm³ para las regiones más rostrales. La estimación de la densidad de neuronas gabaérgicas en las distintas áreas del Vc se representa en la tabla 10.

En lo referente a las neuronas glicinérgicas no se objetiva un gradiente rostrocaudal tan claro. La densidad de las neuronas fuertemente marcadas es de 11.460 / mm³ en las regiones más caudales y baja hasta 9.800 / mm² en las regiones más rostrales. Por su lado la densidad de neuronas glicinérgicas tanto fuerte como débilmente marcadas es de

15.590 / mm³ en las regiones más caudales y baja a 13.770 / mm² en las regiones más rostrales. La estimación de la densidad de neuronas glicinérgicas en las distintas áreas del Vc se representa en la tabla 11.

La figura 21 por su parte, esquematiza la densidad neuronal de las neuronas inmunorreactivas para GABA y glicina en los distintos núcleos del trigémino y para las distintas áreas del Vc.

		Vc			Vip			Vp		
		Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total
UPC3	D	11,1	4,8	15,9	11,1	4,9	16,0	7,4	5,2	12,6
	I	12,5	3,7	16,2	10,9	3,9	14,8	6,8	4,5	11,3
UPC4	D	10,1	3,0	13,1	9,6	5,2	14,8	6,8	5,0	11,8
	I	9,2	3,6	12,8	-	-	-	8,1	5,2	13,3
UPC5	D	10,4	3,6	14,0	-	-	-	8,3	4,7	12,9
	I	10,0	4,7	14,7	-	-	-	8,8	4,3	13,0
UPC6	D	12,1	2,3	14,4	-	-	-	8,6	5,6	14,2
	I	11,5	3,8	15,3	-	-	-	8,3	6,0	14,3
UPC7	D	12,0	3,2	15,2	-	-	-	9,7	4,2	13,9
	I	11,4	2,9	14,3	-	-	-	6,7	4,3	11,0
UPC8	D	8,1	3,1	11,2	-	-	-	6,2	4,1	10,3
	I	9,0	4,0	13,0	-	-	-	7,7	5,1	12,8
est	Media_a	10,8	3,7	14,6	10,5	4,7	15,2	7,8	4,9	12,8
	CV_a	0,11	0,24	0,09	0,08	0,15	0,05	0,10	0,10	0,07
N_v	CE_a	0,012	0,036		0,014	0,005		0,033	0,026	
	est N_b	36,97	12,66	49,63	25,22	11,29	36,51	9,61	6,03	15,64

Tabla 9. Estimación de las neuronas glicinérgicas en los núcleos sensoriales del trigémino. Densidad numérica (N_v, en miles/mm³) y número total de neuronas (N, en miles). No corregido^a, y corregido^b, para el encogimiento del tejido. D: lado derecho; I: lado izquierdo.

		Vc(c)			Vc(i)			Vc(r)		
		Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total
UPC3	D	16,80	8,10	24,90	11,80	5,30	17,10	8,50	2,70	11,20
UPC4	D	11,10	4,60	15,70	5,90	2,20	8,10	4,70	2,00	6,70
	I	7,70	3,40	11,10	9,30	3,60	12,90	4,20	3,50	7,70
UPC5	D	10,60	4,50	15,10	9,30	5,50	14,80	3,80	2,20	6,00
	I	9,48	5,38	14,86	-	-	-	4,01	3,25	7,26
UPC6	D	13,70	4,40	18,10	5,70	2,10	7,80	3,60	1,80	5,40
UPC7	D	9,70	3,20	12,90	5,50	2,30	7,80	3,90	2,90	6,80
	I	13,00	7,60	20,60	5,40	3,40	8,80	5,20	2,60	7,80
UPC8	I	8,60	3,30	11,90	4,50	3,20	7,70	4,20	1,60	5,80
<i>est</i> <i>N_v</i>	Media_a	11,19	4,94	16,13	7,18	3,45	10,63	4,68	2,51	7,18
	CV_a	0,25	0,36	0,27	0,36	0,38	0,35	0,32	0,26	0,24
	CE_a	0,021	0,047		0,023	0,051		0,029	0,048	

Tabla 10. Estimación de las neuronas gabaérgicas en las distintas áreas del Vc del trigémino.
Densidad numérica (N_v , en miles/mm³) para un volumen no corregido. D: lado derecho; I: lado izquierdo.

		Vc(c)			Vc(i)			Vc(r)		
		Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total
UPC3	D	13,86	5,66	19,52	11,67	3,82	15,49	9,27	5,08	14,35
	I	13,95	2,32	16,27	11,42	2,85	14,27	12,79	4,65	17,44
UPC4	I	9,89	3,60	13,49	-	-		8,74	3,74	12,48
UPC5	D	11,02	4,02	15,04	10,79	4,86	15,65	9,51	2,49	12,00
UPC6	D	8,63	5,58	14,21	6,77	5,98	12,75	8,99	5,50	14,49
UPC7	D	-	-		10,50	1,40	11,90	9,45	3,45	12,90
	I	13,47	4,00	17,47	11,68	2,92	14,60	11,30	2,92	14,22
UPC8	I	9,37	3,75	13,12	9,42	4,27	13,69	8,33	3,96	12,29
<i>est</i> <i>N_v</i>	Media_a	11,46	4,13	15,59	10,32	3,73	14,05	9,80	3,97	13,77
	CV_a	0,20	0,28	0,15	0,17	0,40	0,10	0,15	0,26	0,13
	CE_a	0,019	0,043		0,024	0,045		0,027	0,049	

Tabla 11. Estimación de las neuronas glicinérgicas en las distintas áreas del Vc del trigémino.
Densidad numérica (N_v , en miles/mm³) para un volumen no corregido. D: lado derecho; I: lado izquierdo.

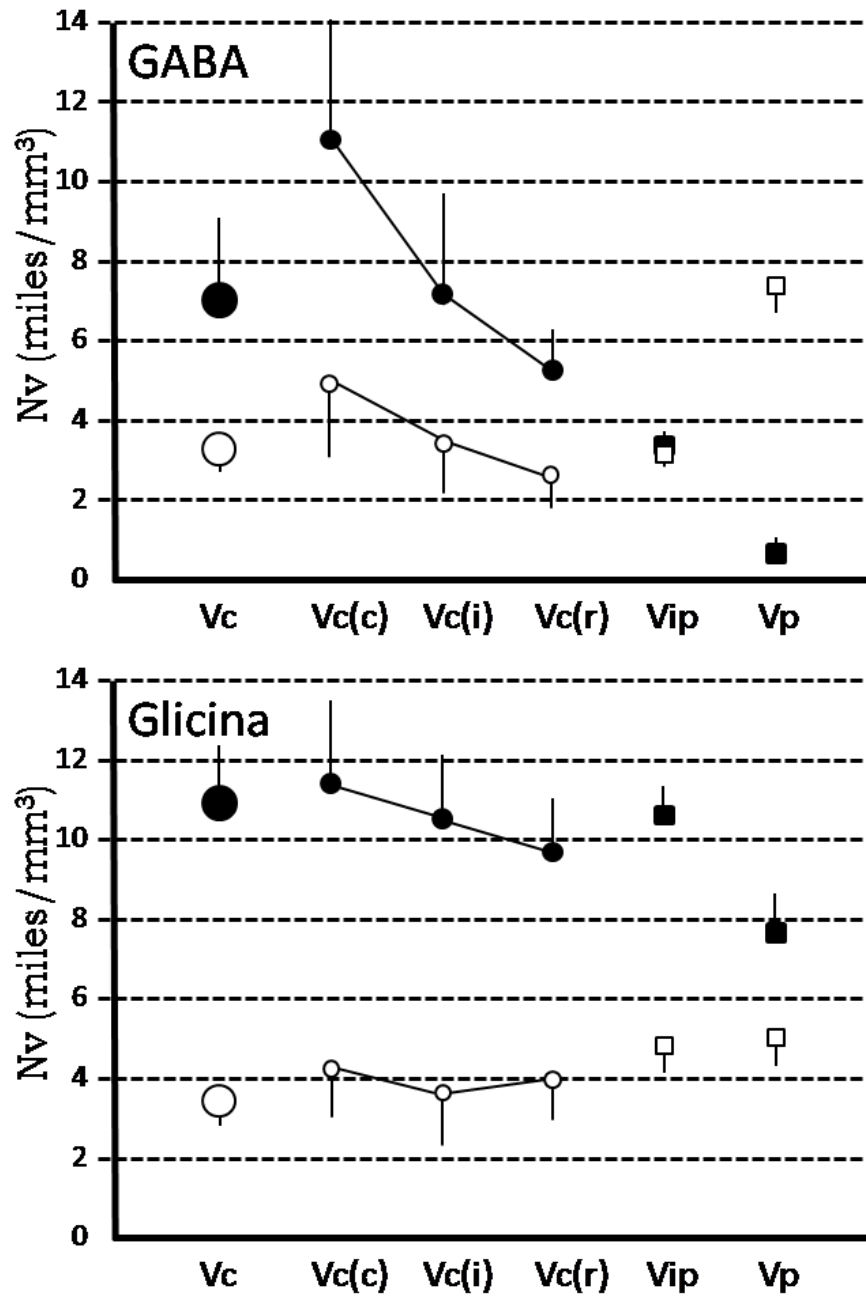


Figura 21. Densidad numérica (media y desviación estándar) de las neuronas inmunorreactivas para GABA y glicina en los núcleos del trigémino. Se representan por separado las neuronas fuertemente marcadas (símbolos compacto) y las débilmente marcadas (símbolos vacíos). Las neuronas gabaérgicas en el Vc se incrementan significativamente desde el nivel rostral al intermedio y caudal.

4.2.2 Análisis densitométrico

El análisis densitométrico desarrollado sobre secciones ya utilizadas para la cuantificación mostró un 15% de solapamiento entre las neuronas fuertemente marcadas y las débilmente marcadas para GABA, mientras que prácticamente no existió solapamiento entre estas últimas y las clasificadas como no marcadas (figura 22). Aunque este pequeño solapamiento es tolerable, representa una sobreestimación ya que los valores obtenidos corresponden a los perfiles neuronales de 16 campos diferentes del Vc en ocho secciones de dos animales. Aunque los valores en la escala de grises fueron normalizados (ver Materiales y Métodos), el ruido introducido por la obtención de datos de muchas secciones diferentes es mayor que la incertidumbre que surge cuando se clasifican las células de una sección determinada. El aspecto general y la distribución de las neuronas gabaérgicas concuerda con las descripciones anteriores (Ottersen y Storm-Mathisen, 1984; Ginestal y Matute, 1993)

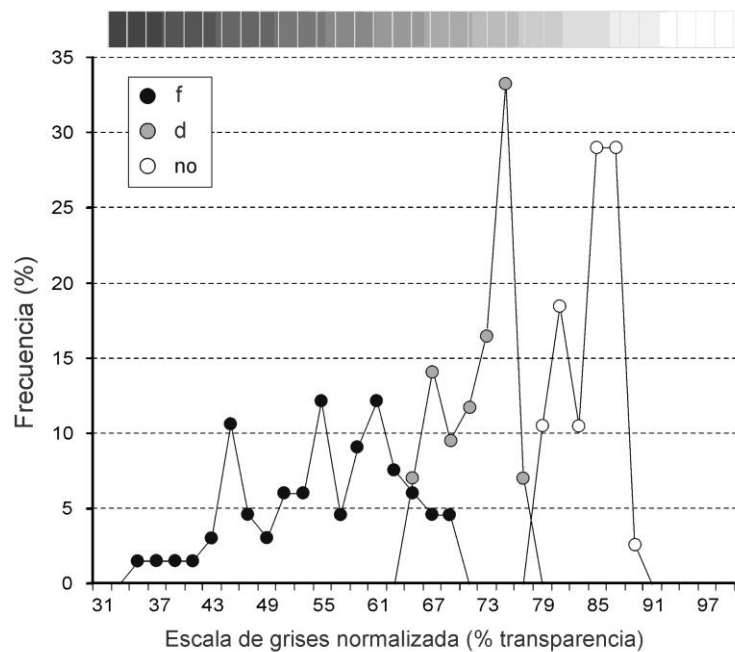


Figura 22. Análisis densitométrico. Resultados medios del análisis densitométrico de un conjunto de perfiles celulares gabaérgicos o glicinérgicos en corte semifino del Vc en dos ratas. Los valores de gris medidos en las células fueron normalizados utilizando la luminancia media a partir del lumen de los vasos sanguíneos en las mismas secciones (ver Materiales y Métodos). Se observó un gradiente continuo en la intensidad del marcado, que lleva a un moderado solapamiento entre las poblaciones de células clasificadas como fuertes y débiles. Sin embargo, apenas existió solapamiento entre las débilmente marcadas y las clasificadas como no marcadas. F= fuertemente marcadas, d= débilmente marcadas, no = no marcadas

4.2.3 Distribución laminar de las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas

Tanto las neuronas gabaérgicas como glicinérgicas muestran una distribución irregular en los diferentes subnúcleos del trigémino, sin predisposición por ninguna zona de ellos. Esta distribución se representa en la figura 23.

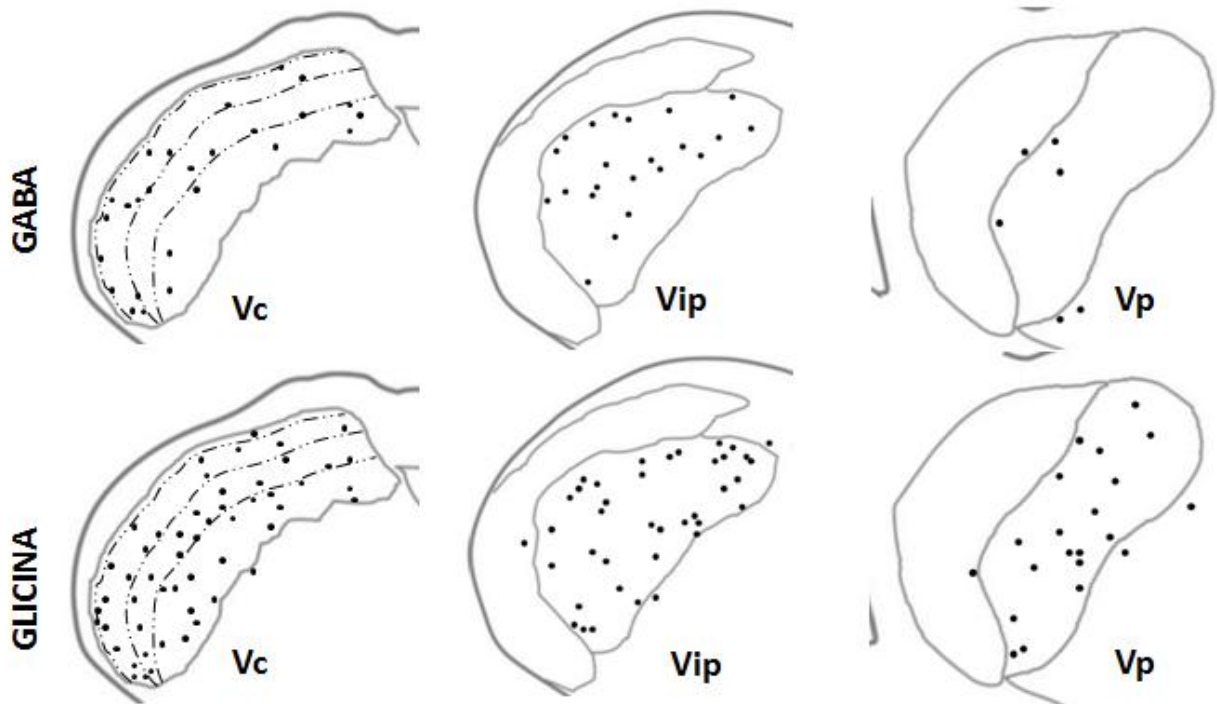


Figura 23. Distribución laminar de las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas en los diferentes subnúcleos del trigémino. Se representa la distribución de las neuronas fuertemente marcadas (gabaérgicas arriba y glicinérgicas abajo) en los núcleos Vp, Vip y Vc. En este último se indican las diferentes láminas en las que se subdivide.

4.2.4 Colocalización neuronal de la expresión de GABA y glicina

La coexistencia de GABA y glicina en la misma célula fue un hallazgo frecuente. Respecto a la intensidad de la expresión, se encontraron todas las posibles combinaciones: desde neuronas que expresaban únicamente una de las dos moléculas con una intensidad débil hasta neuronas que expresaban ambas de un modo fuerte. La figura 24 representa un ejemplo real de neuronas inmunorreactivas para GABA y glicina en secciones consecutivas reactivas del Vp y la figura 25 representa un diagrama de los núcleos Vc y Vp mostrando la localización de los somas neuronales y representa las diferentes combinaciones de expresión de GABA y glicina. En general, todas las neuronas fuertemente marcadas para GABA fueron pequeñas, sin importar la coexpresión o no de glicina. Por su parte las neuronas débilmente marcadas para GABA que coexpresaban glicina eran más grandes que aquellas que no la coexpresaban.

La cuantificación de las neuronas marcadas con GABA y glicina de una forma grosera mediante cámara lúcida permite estimar alrededor de un 75% de neuronas marcadas en el Vp que coexpresan ambos marcadores, la mayoría de las cuales con una inmunoreactividad débil para GABA. En el núcleo Vc, el número de neuronas que expresan GABA y/o glicina en diferentes combinaciones se determinó de una forma más precisa y su contribución relativa y su contribución relativa a la población total de neuronas marcadas se representa en la figura 25. Alrededor del 48% de las neuronas estaban marcadas únicamente para GABA o para glicina, mientras que el 52% de las neuronas marcadas lo estaban para ambas sustancias en diferentes combinaciones de marcado. El 44% correspondían a neuronas fuertemente marcadas para GABA (con o sin coexpresión de glicina) mientras que existía una proporción similar de neuronas que estaban fuertemente marcadas para glicina (con o sin coexpresión de GABA). A lo largo de las diferentes regiones del Vc, las proporciones variaban sustancialmente ya que la proporción de neuronas gabaérgicas se incrementaba de forma relativa en dirección caudal mientras que las neuronas glicinérgicas presentaban una distribución más homogénea. Aparte de este gradiente, las células que coexpresaban GABA y glicina no exhibieron un patrón definido en su distribución en los diferentes grupos o regiones.

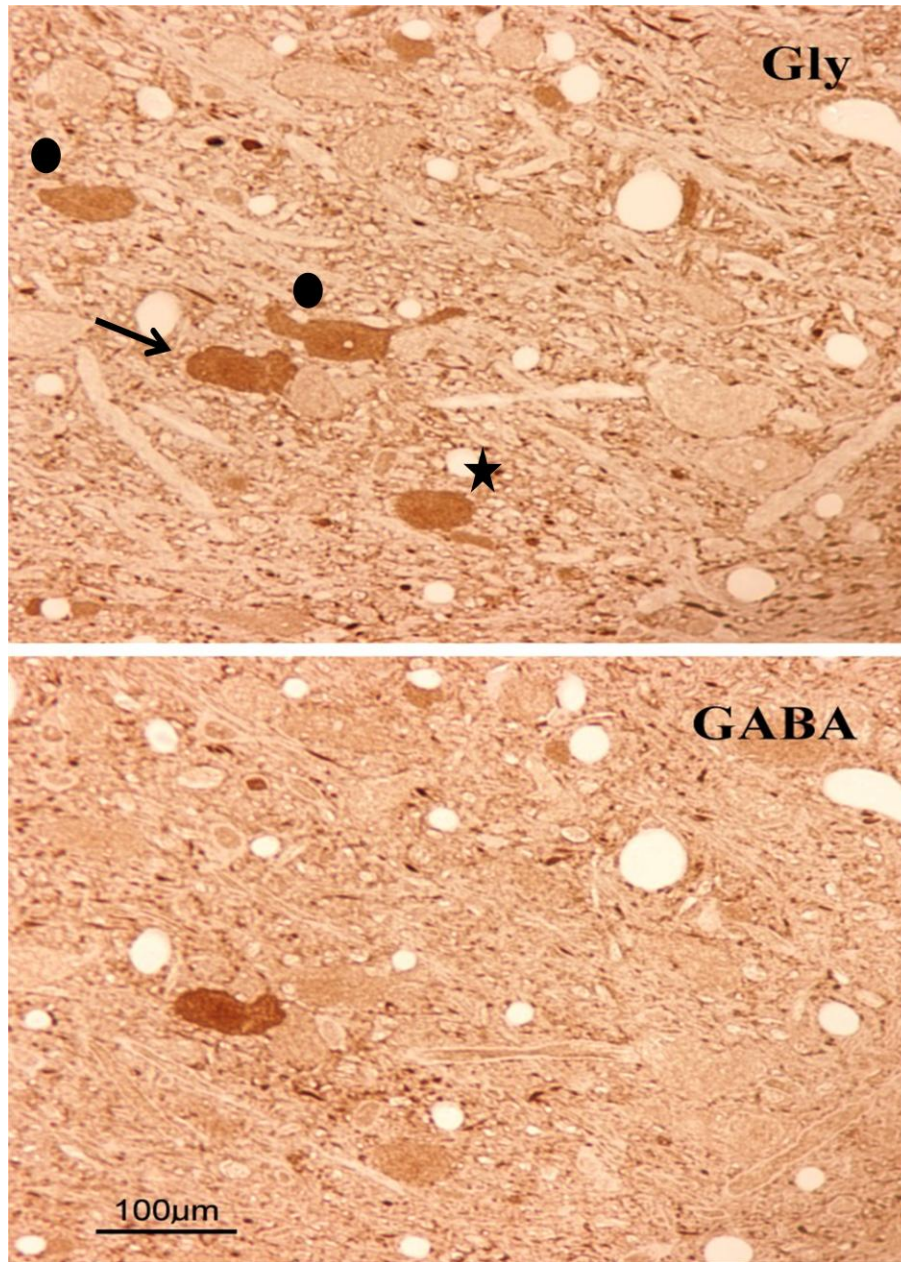


Figura 24. Se representa un ejemplo real de células inmunorreactivas en el Vp en dos secciones consecutivas reactivas para glicina y para GABA. La neurona marcada con una flecha muestra una inmunorreactividad fuerte para glicina y fuerte para GABA. La marcada con una estrella es fuerte para glicina y débil para GABA y las marcadas con puntos muestran inmunorreactividad fuerte para glicina y no expresan GABA.

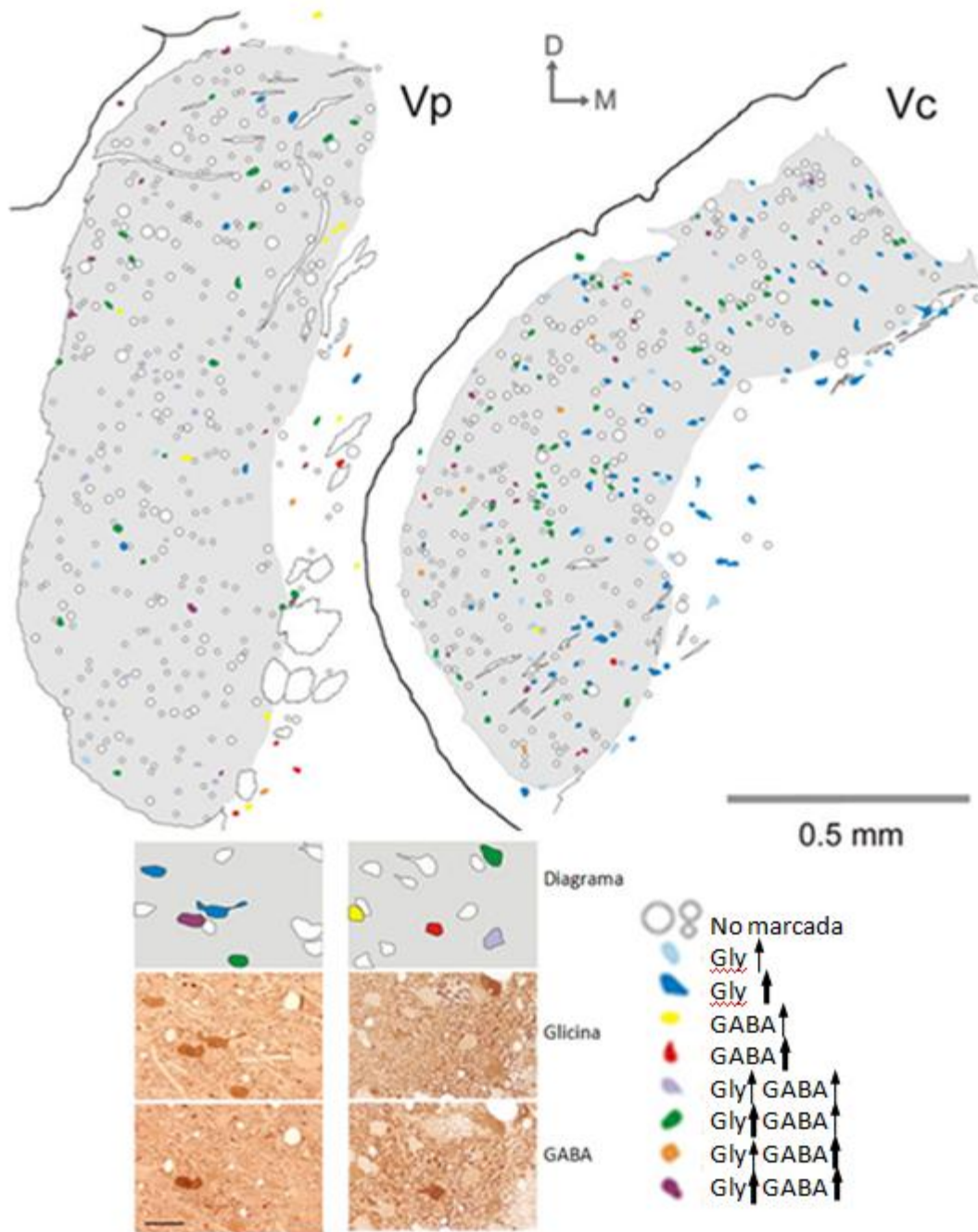


Figura 25. Diagramas dibujados con cámara lúcida de los subnúcleos Vc y Vp del trigémino mostrando la localización de los somas neuronales en aquellas neuronas en las que el núcleo ha sido cortado transversalmente. Las células están representadas en un código de colores que representas las diferentes combinaciones de expresión de GABA y glicina. Cada forma coloreada corresponde a una sola neurona. D, dorsal; M, medial.

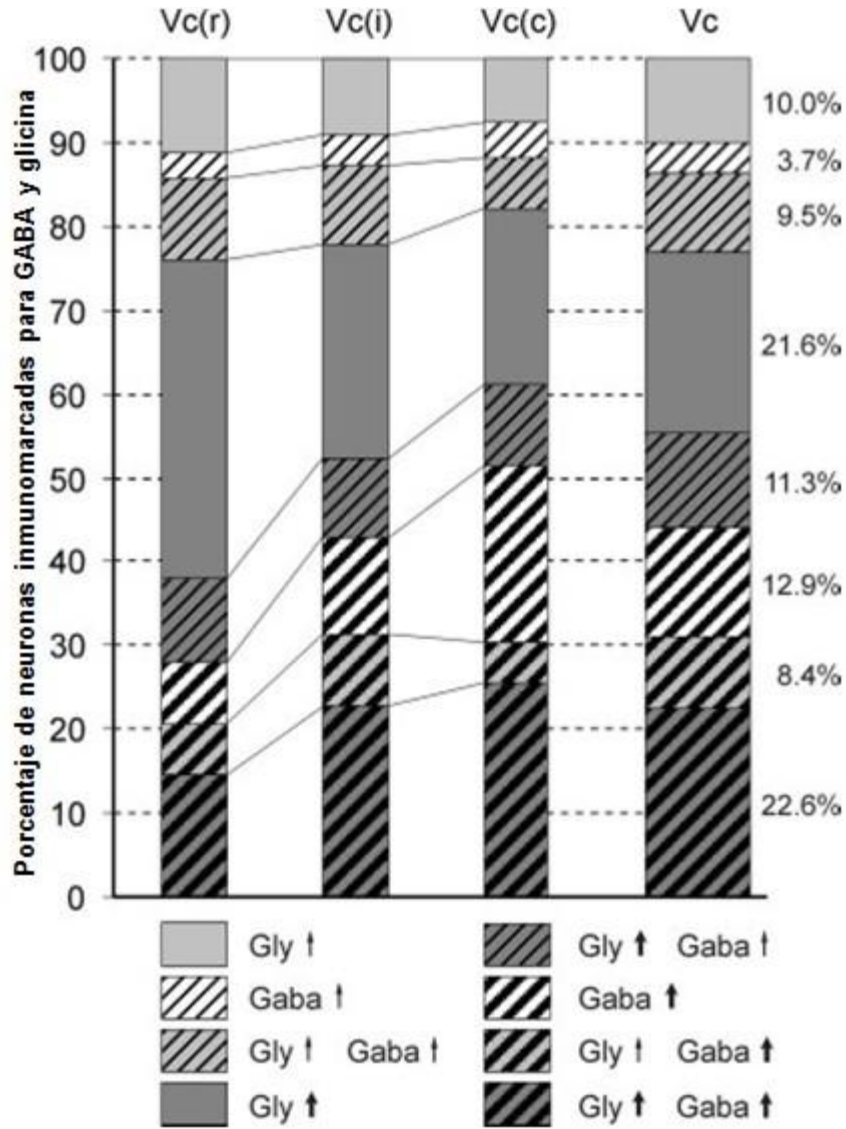


Figura 26. Distribución de porcentajes de todas las neuronas inmunorreactivas, para las células que expresan diferentes grados de GABA y/o glicina en el Vc y en sus diferentes regiones. Las células fuerte y débilmente inmunorreactivas para GABA están representadas en un sombreado grueso y fino respectivamente. El área coloreada de gris representa las neuronas glicinérgicas fuertes (en gris oscuro) y débiles (en gris claro).

4.2.5 Ausencia de GABA y glicina en las neuronas de proyección talámica

El rastreo de neuronas de proyección talámica, es decir, marcadas con HRP que expresasen GABA y/o glicina no consiguió evidenciar ninguna de ellas con estas características en los dos animales estudiados. Estos resultados fueron negativos tanto para las neuronas gabaérgicas como para las glicinérgicas.

Las neuronas de proyección talámica eran, por lo general, de mayor tamaño que las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas que por lo general tienen un tamaño ligeramente menor. Estos resultados están de acuerdo con otros publicados anteriormente por otros autores (Di Figlia y Aronin, 1990; Haring et al., 1990).

Las neuronas de proyección trigeminotalámica y las inmunorreactivas para GABA y glicina tienen una distribución claramente diferente. Por un lado las neuronas de proyección predominan claramente en el Vp, seguido muy de lejos por el Vip, las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas están presentes en todos los núcleos, siendo particularmente abundantes en los núcleos trigeminales Vc y Vip.

La figura 27 muestra dos secciones consecutivas del núcleo Vp en las que se ha realizado una inmunohistoquímica para GABA y un revelado de HRP. Se aprecia que las neuronas de proyección talámica no expresan GABA y que a las neuronas gabaérgicas no se transporta el HRP.

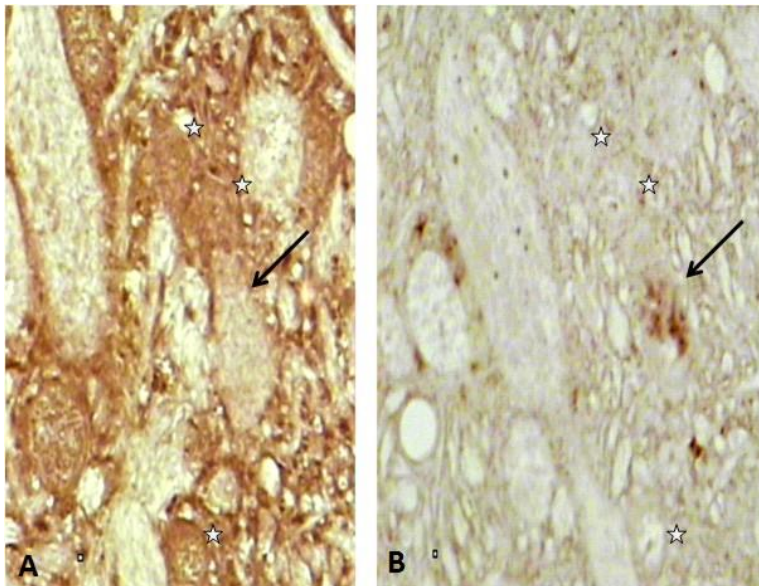


Figura 27. Ausencia de GABA en las neuronas de proyección talámica. Se muestran dos secciones consecutivas del núcleo Vp. En la sección A se ha realizado una inmunohistoquímica para GABA y en ella se objetivan tres neuronas gabaérgicas (marcadas con una estrella). La imagen B muestra una neurona de proyección talámica (marcada con una flecha) demostrada por la presencia de HRP en su interior. Se comprueba que las neuronas gabaérgicas no coinciden con las neuronas de proyección talámica.

Se comprueba que las neuronas gabaérgicas no coinciden con las neuronas de proyección talámica.

4.3 DOLOR NEUROPÁTICO EXPERIMENTAL Y NÚCLEOS DEL TRIGÉMINO

4.3.1 Respuesta de las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas tras la CCI-IoN

Los animales a los que se les había realizado una CCI-IoN presentaron dos fases claramente diferenciadas. La primera de ellas, de dos semanas de duración, destacaba por una clara anestesia a la exploración del área de vibrisas ipsilateral a la cirugía, del mismo modo a como ya se ha descrito en otros estudios (Christensen et al., 1999; Idänpää-Heikkilä y Guilbaud, 1999). Tras dos semanas de la cirugía, las ratas desarrollaron una hipersensibilidad a los estímulos mecánicos en el territorio del nervio ligado respecto al lado control. Sin embargo, y a diferencia de otros estudios publicados, estas ratas no mostraron un aumento paralelo de la respuesta a la estimulación del área de vibrisas contralateral a la cirugía. La figura 28 muestra la conducta algésica de los animales explorados.

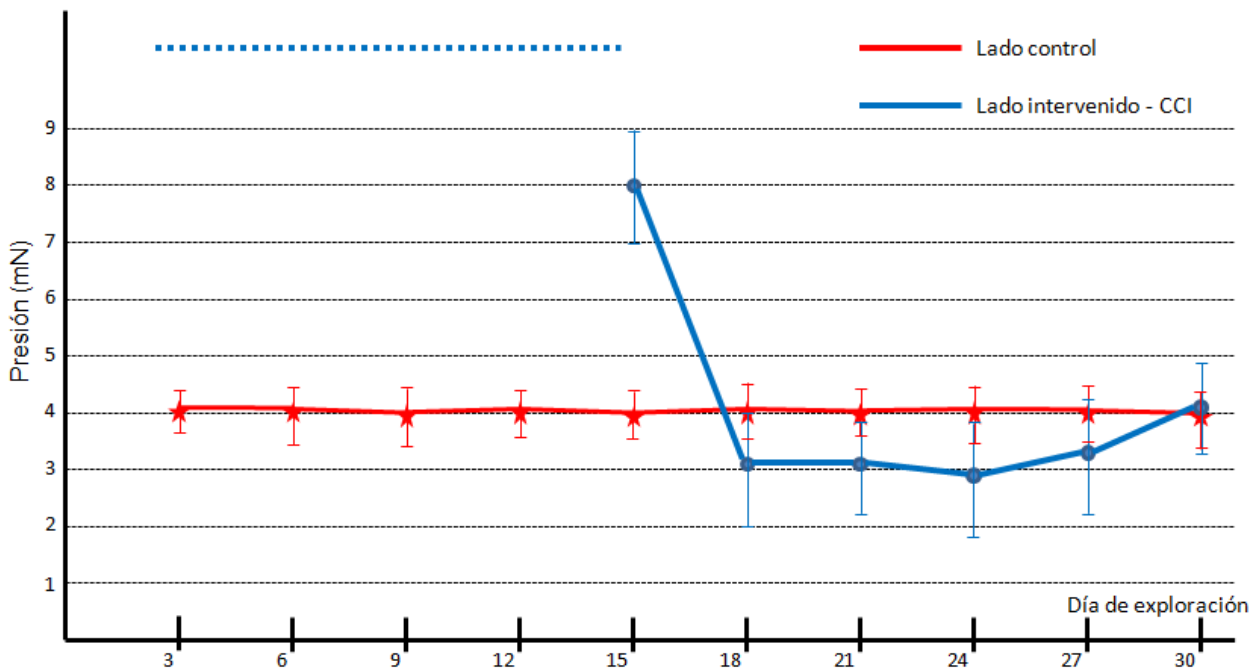


Figura 28. Conducta algésica de los animales intervenidos mediante CCI. Se representa el lado control (siempre el derecho) frente al lado intervenido (siempre el izquierdo). La línea discontinua en azul representa el período de anestesia completa típica de los primeros 15 días tras la cirugía.

La CCI-IoN provocó una disminución en la expresión de las neuronas gabaérgicas en el núcleo Vc del lado intervenido (izquierdo) a expensas de las neuronas fuertemente marcadas. Dicha disminución fue estadísticamente significativa ($P < 0,001$) aunque dicho grado de significación no se obtuvo para el total de las neuronas, lo que hace suponer que las neuronas gabaérgicas fuertemente marcadas tienen una menor inmunorreactividad para GABA que en condiciones basales y que estas neuronas son cuantificadas como neuronas débilmente marcadas. Si se estudian por separado las diferentes regiones del Vc, se comprueba que la disminución de las neuronas gabaérgicas se produce fundamentalmente a expensas de la región caudal, área del núcleo en la que también se objetiva una reducción del conjunto de neuronas gabaérgicas y no sólo de las fuertemente marcadas. Para ambas variables se obtiene una disminución estadísticamente significativa con $P < 0,001$. Para el resto de regiones del Vc no se obtiene significación estadística para el descenso de las neuronas fuertemente marcadas ni para el conjunto de ellas.

En la CxSS contralateral, la correspondiente al lado intervenido, se observa una disminución estadísticamente significativa ($P < 0,05$) de las neuronas fuertemente marcadas y un claro aumento de las débilmente marcadas lo que lleva a pensar que algunas neuronas gabaérgicas fuertemente marcadas tienen una menor inmunorreactividad para GABA tras la CCI-IoN que en condiciones basales y que son cuantificadas como neuronas débilmente marcadas.

El estudio de los lados control (núcleo Vc contralateral y CxSS ipsilateral a la cirugía) no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a los animales no intervenidos para ninguna de las variables estudiadas.

Las tablas 12 y 13 muestran una estimación de las neuronas gabaérgicas en el Vc y sus distintas regiones y en la CxSS tras la realización de una CCI. Por su parte la figura 29 muestra la variación de estas estructuras respecto al grupo control y el estudio estadístico realizado.

LADO INTERVENIDO	Vc (Izquierdo)			CxSS (Derecha)		
	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total
UPI3	3,97	3,42	7,39	1,92	1,63	3,55
UPI6	5,24	3,76	9,00	3,23	3,30	6,53
UPI7	5,33	3,36	8,69	3,12	5,32	8,44
UPI8	5,37	5,04	10,41	2,36	3,09	5,45
Media_a	4,98	3,90	8,87	2,66	3,34	5,99
<i>est N_v</i> CV_a	0,13	0,20	0,14	0,23	0,45	0,34
CE_a	0,012	0,020		0,012	0,021	
est N_b	17,05	13,35	30,40			
% Var	-28,6%	+15,4%	-14,5%	-18,2%	+47,1%	+8,7%
LADO CONTROL	Vc (Derecho)			CxSS (Izquierda)		
	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total
UPI3	5,31	2,86	8,17	3,03	2,19	5,22
UPI6	7,39	4,15	11,54	–	–	–
UPI7	6,50	4,60	11,10	3,43	2,83	6,25
UPI8	6,48	5,16	11,64	3,76	4,31	8,47
Media_a	6,42	4,19	10,61	3,41	3,24	6,65
<i>est N_v</i> CV_a	0,13	0,23	0,15	0,11	0,40	0,25
CE_a	0,015	0,021		0,011	0,018	
est N_b	21,98	13,34	36,32			

Tabla 12. Estimación de las neuronas gabaérgicas en el Vc y en la CxSS tras la realización de una CCI. Se representan por separado el lado control y el intervenido. Densidad numérica (N_v , en miles/mm³) y número total de neuronas (N , en miles). No corregido_a, y corregido_b, para el encogimiento del tejido. % Var: porcentaje de variación respecto al grupo control.

LADO		Vc(c)			Vc(i)			Vc(r)		
INTERVENIDO		Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total
	UPI3	5,38	4,73	10,11	7,33	1,63	8,96	3,94	2,95	6,89
	UPI6	6,07	4,99	11,06	7,46	4,42	11,88	3,19	2,59	5,78
	UPI7	6,86	4,80	11,66	4,13	2,22	6,35	5,07	3,12	8,19
	UPI8	5,88	6,16	12,04	5,41	3,83	9,24	5,05	5,49	10,54
	Media	6,05	5,17	11,22	6,08	3,03	9,11	4,31	3,54	7,85
est Nv	CV	0,6	0,7	0,8	1,6	1,3	2,3	0,9	1,3	2,0
	CE	0,023	0,046		0,019	0,031		0,024	0,037	
	% Var	-45,9%	4,66%	-30,4%	-15,3%	-12,2%	-14,3%	-7,9%	41,0%	9,33%
LADO		Vc(c)			Vc(i)			Vc(r)		
CONTROL		Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total
	UPI3	6,38	7,88	14,26	3,43	3,19	6,62	3,76	2,32	6,08
	UPI6	10,12	3,89	14,01	7,33	1,63	8,96	5,21	2,64	7,85
	UPI7	6,62	5,84	12,46	10,94	3,18	14,12	5,62	4,84	10,46
	UPI8	8,56	5,14	13,70	8,56	3,11	11,67	4,39	4,04	8,43
	Media	7,92	6,09	14,01	7,57	2,96	10,53	4,75	3,46	8,21
est Nv	CV	0,22	0,28	0,08	0,41	0,32	0,32	0,18	0,34	0,22
	CE	0,024	0,043		0,021	0,033		0,025	0,034	

Tabla 13. Estimación de las neuronas gabaérgicas en las diferentes regiones del núcleo Vc tras la realización de una CCI. Se representan por separado el lado control y el intervenido. Densidad numérica no corregida para en encogimiento del tejido (N_v , en miles/mm³).

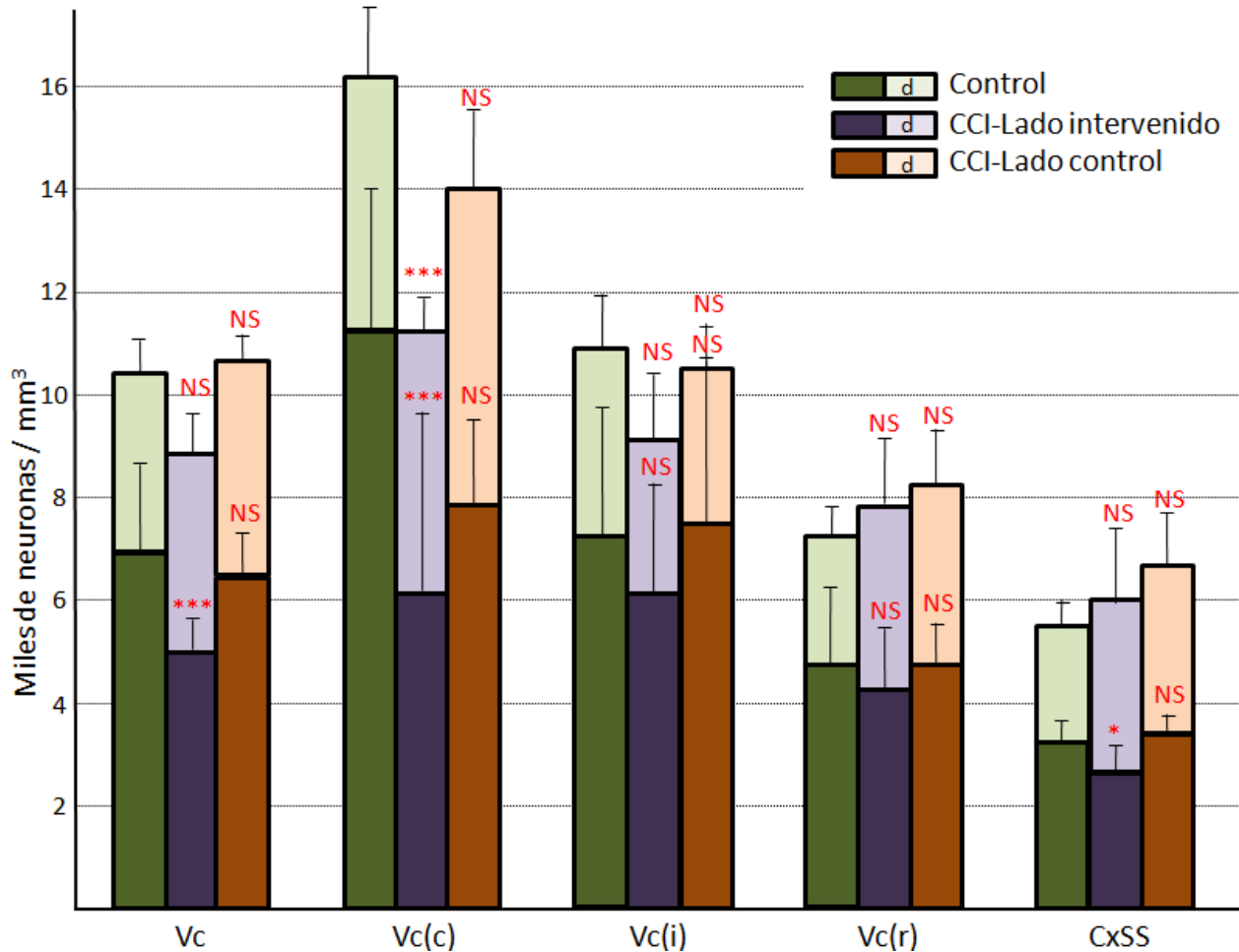


Figura 29. Respuesta de las neuronas gabaérgicas de los núcleos del trigémino y de la corteza cerebral tras la realización de una CCI. Se aprecia un claro descenso en el número de neuronas gabaérgicas fuertemente marcadas en el Vc ipsilateral a la CCI ($P < 0,001$), pero no para el número total de neuronas. Respecto a las diferentes áreas del núcleo Vc se comprueba que el descenso más importante tiene lugar en la región caudal, mientras que esta disminución no es significativa para el nivel intermedio ni el rostral. También se objetiva una disminución significativa ($P < 0,05$) en la cuantificación de neuronas gabaérgicas fuertemente marcadas para la CxSS contralateral a la CCI. El lado control de los animales intervenidos (Vc derecho y CxSS izquierda) no muestran diferencias respecto a los animales controles. Los asteriscos indican el grado de significación estadística (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; NS: no significativo). La fila superior indica la significación estadística para el número total de neuronas gabaérgicas mientras que la fila inferior indica la significación estadística de las neuronas fuertemente marcadas.

Respecto a las neuronas glicinérgicas, la CCI-IoN provocó una disminución estadísticamente significativa ($P < 0,05$) en el núcleo Vc del lado intervenido (izquierdo) que se evidenció tanto para las neuronas fuertemente marcadas como para el conjunto de neuronas glicinérgicas. Esta reducción fue similar en las diferentes regiones del Vc, no observándose el gradiente rostrocaudal que se objetivó en las neuronas gabaérgicas. El hecho de que el número de neuronas analizadas sea inferior al estudiar cada uno de estas áreas por separado que al estudiar el núcleo Vc en su conjunto hace que las tendencias de descenso de neuronas glicinérgicas no alcance significación estadística ($P > 0,05$)

El estudio del lado control, el núcleo Vc contralateral a la CCI, no mostró diferencias estadísticamente significativas respecto a los animales no intervenidos ni para las neuronas glicinérgicas fuertemente marcadas ni para el conjunto de las neuronas glicinérgicas ($P > 0,05$).

La tabla 14 muestra una estimación de las neuronas glicinérgicas en el Vc y en sus distintas regiones tras la realización de una CCI, tanto para el lado control como para el lado intervenido. Por su parte, la figura 30 muestra la variación de estas estructuras respecto al grupo control y el estudio estadístico realizado al respecto.

LADO INTERVENIDO	Vc			Vc(c)			Vc(i)			Vc(r)		
	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total
UPI3	10,60	3,20	13,80	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UPI6	8,80	3,50	12,30	6,38	5,72	12,10	10,94	3,20	14,14	9,11	3,25	12,36
UPI7	9,40	4,30	13,70	12,06	2,78	14,84	10,48	2,83	13,31	9,31	6,63	15,94
UPI8	8,90	4,50	13,40	10,68	2,86	13,54	7,96	3,94	11,90	8,46	5,25	13,71
Media _a	9,43	3,88	13,30	9,71	3,79	13,49	9,79	3,32	13,12	8,96	5,04	14,00
est N _v CV _a	0,087	0,161	0,051	0,10	0,13	0,08	0,26	0,43	0,25	0,21	0,37	0,26
CE _a	0,014	0,031		0,025	0,053		0,022	0,038		0,029	0,046	
Est N _b	32,28	13,28	45,56									
% Var	-12,7%	+4,8%	-8,9%	-15,3%	-8,2%	-13,5%	-5,1%	-11,0%	-6,6%	-8,6%	+27,0%	+1,7%
LADO CONTROL	Vc			Vc(c)			Vc(i)			Vc(r)		
	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total
UPI3	11,3	3,1	14,40	-	-	-	-	-	-	-	-	-
UPI6	8,40	4,20	12,60	8,73	4,26	12,99	9,04	3,59	12,63	9,81	3,70	13,51
UPI7	10,60	3,80	14,40	12,42	4,21	16,63	11,47	4,09	15,56	8,27	4,83	13,10
UPI8	10,00	4,50	14,50	9,56	6,14	15,70	9,56	4,11	13,67	10,44	3,96	14,40
Media _a	10,08	3,90	13,98	10,24	4,87	15,11	10,02	3,93	13,95	9,51	4,16	13,67
est N _v CV _a	0,123	0,155	0,065	0,22	0,28	0,08	0,41	0,32	0,32	0,18	0,34	0,22
CE _a	0,013	0,029		0,023	0,047		0,019	0,033		0,026	0,041	
Est N _b	34,50	13,35	47,85									

Tabla 14. Estimación de las neuronas glicinérgicas en el núcleo Vc y en sus diferentes regiones tras la realización de CCI. Se representan por separado el lado control y el intervenido. Densidad numérica (N_v, en miles/mm³) y número total de neuronas (N, en miles). No corregido_a, y corregido_b, para el encogimiento del tejido. % Var: porcentaje de variación respecto al grupo control.

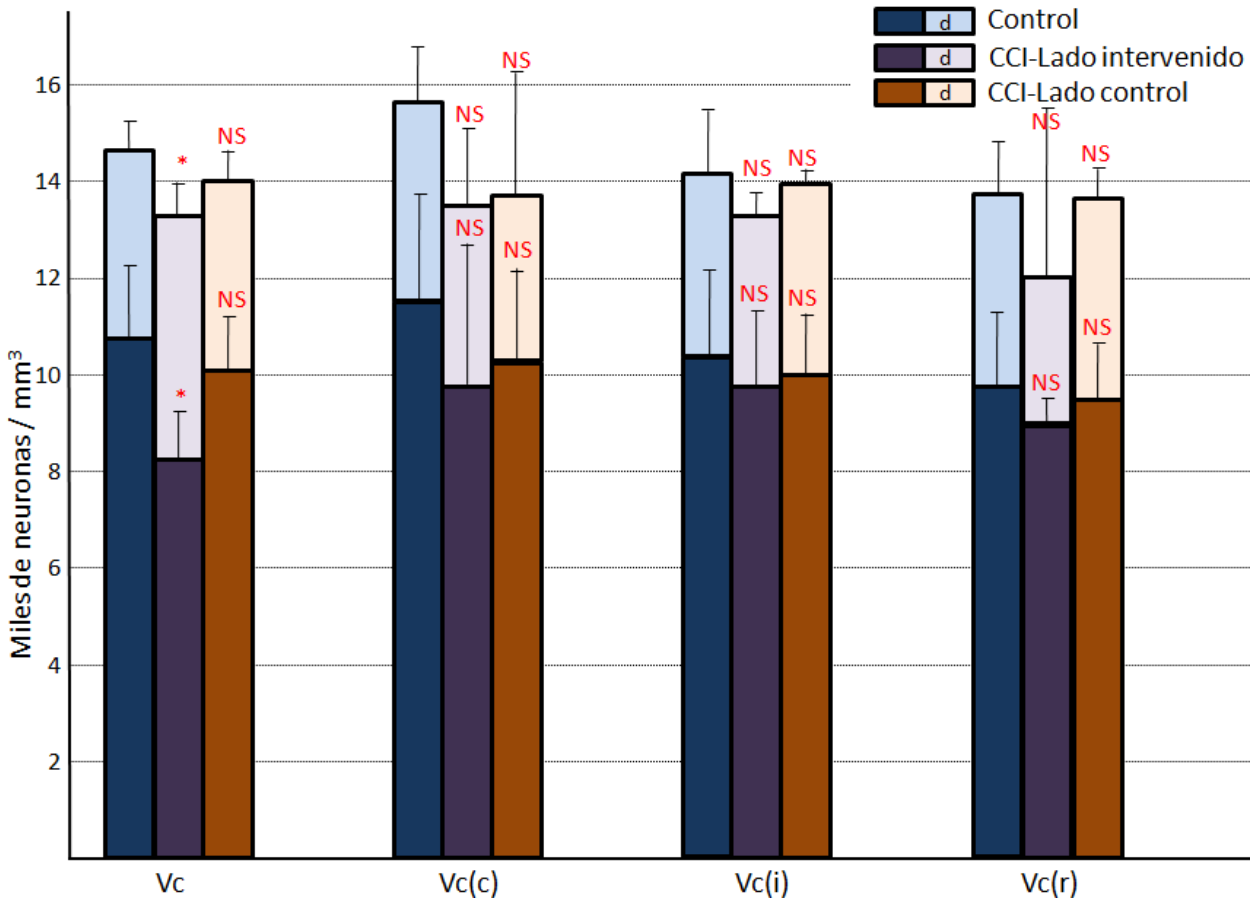


Figura 30. Respuesta de las neuronas glicinérgicas de los núcleos del trigémino tras la realización de una CCI. Se aprecia una disminución en el número de neuronas glicinérgicas fuertemente marcadas y en el número total de neuronas glicinérgicas en el Vc ($P < 0,05$). Respecto a las diferentes áreas del núcleo Vc estudiadas no se consigue obtener un descenso estadísticamente significativo para ninguna de ellas, aunque sí una tendencia de disminución del número total de neuronas glicinérgicas y de aquellas fuertemente marcadas. El lado control de los animales intervenidos (Vc derecho) no muestra diferencias respecto a los animales controles. Los asteriscos indican el grado de significación estadística (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; NS: no significativo). La fila superior indica la significación estadística para el número total de neuronas glicinérgicas mientras que la fila inferior indica la significación estadística de las neuronas fuertemente marcadas.

4.3.2 Respuesta de las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas a la administración de GBP

La administración de GBP produce una clara disminución en la expresión de neuronas gabaérgicas y glicinérgicas en los diferentes núcleos del trigémino estudiados mientras que estos cambios no se reproducen en la CxSS. Estas modificaciones pueden apreciarse a la simple inspección óptica como queda patente en las figuras 31 a 34.

La densidad numérica de las células que expresan GABA y/o glicina se representa en las tablas 15 a 18. La mayor densidad de neuronas gabaérgicas tras la administración de GBP continúa encontrándose en el Vc, sobre todo en su región caudal, aunque el gradiente rostrocaudal creciente deja de ser tan pronunciado como en los controles debido a que la región caudal es la que más se afecta tras la aplicación de la GBP y, por tanto, es en la que se produce una mayor disminución de neuronas gabaérgicas. La mayor variación de neuronas gabaérgicas se produce en el Vp con un descenso del 69,9% en las neuronas fuertemente marcadas. Un descenso menor se produce en el Vc, con el 47,9% y menor aún en el Vip con una variación del 26,4%. Por su parte, respecto a las diferentes áreas del Vc se produce un mayor descenso de la inmunorreactividad gabaérgica en la región caudal, con un descenso de las neuronas gabaérgicas fuertemente marcadas en el 59,2%, el cual disminuye al 46,9% en la región intermedia del Vc y al 33,4% en las regiones más rostrales, las cuales corresponden a una menor expresión de neuronas gabaérgicas.

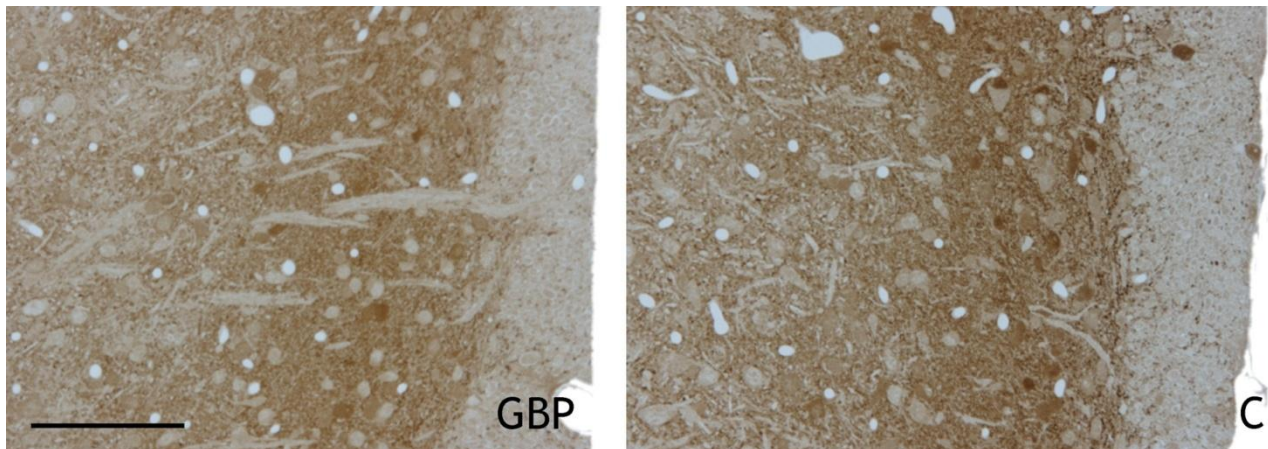


Figura 31. Inmunohistoquímica para GABA en el Vc. Se observa una clara disminución del marcaje neuronal en aquellos animales tratados con GBP respecto a los animales controles. Barra de escala = 100 μ m.

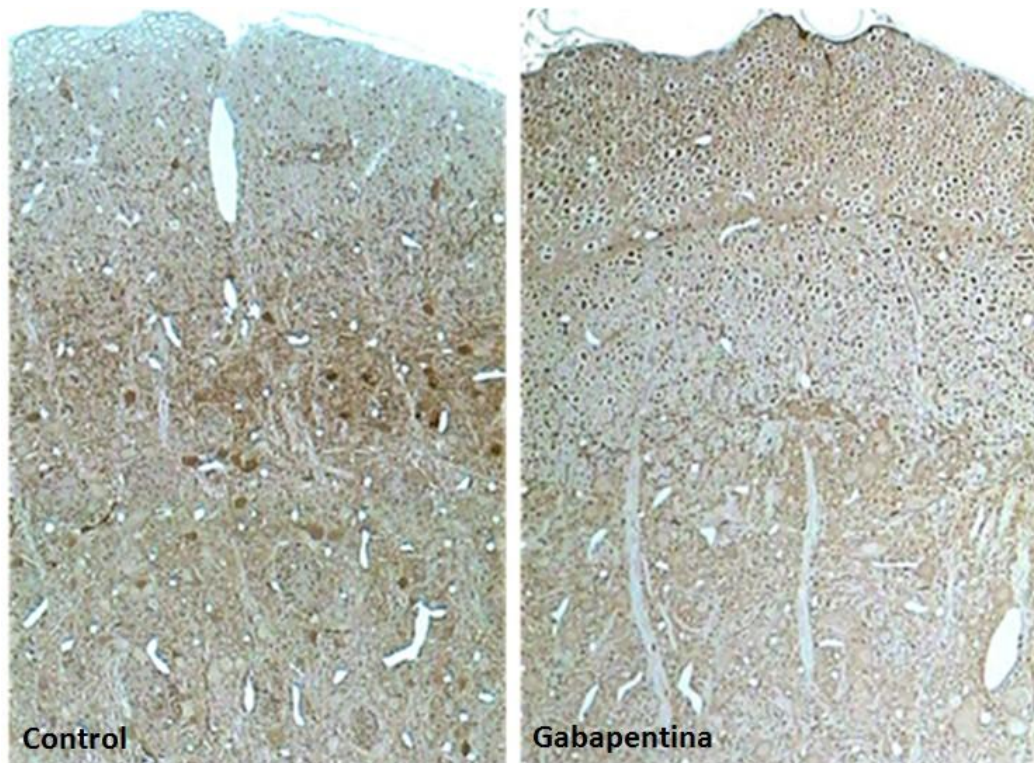


Figura 32. Inmunohistoquímica para GABA en el Vp. Se observa una clara disminución del marcaje neuronal en aquellos animales tratados con GBP respecto a los animales controles.

Tras la corrección para el encogimiento del tejido (ver Materiales y Métodos), el número medio de neuronas fuertemente marcadas osciló entre 960 para el Vp y 23.890 para el Vc, pasando por 8.340 para el Vip. Estos números suponen un 2,7%, el 14,5% y el 13,7% respectivamente del número total de neuronas de los núcleos trigeminales. Por su lado el número total de neuronas gabaérgicas (tanto las fuerte como las débilmente marcadas) tras la corrección para el encogimiento del tejido fue de 35.460 para el Vc, 15.950 para el Vip y de 10.220 para el Vp, lo que supone un 21,56%, un 26,23% y un 28,95% respectivamente del número total de neuronas para cada uno de los diferentes núcleos trigeminales. Todos los descensos en las neuronas gabaérgicas fuertemente marcadas y en su número total fueron estadísticamente significativas en todos los núcleos del trigémino, así como las distintas divisiones del Vc a excepción del descenso del total de neuronas gabaérgicas en la división rostral del Vc. En la corteza cerebral no se produjo un descenso significativo en las neuronas gabaérgicas, ni en lo referente a las fuertemente marcadas ni al conjunto de ellas.

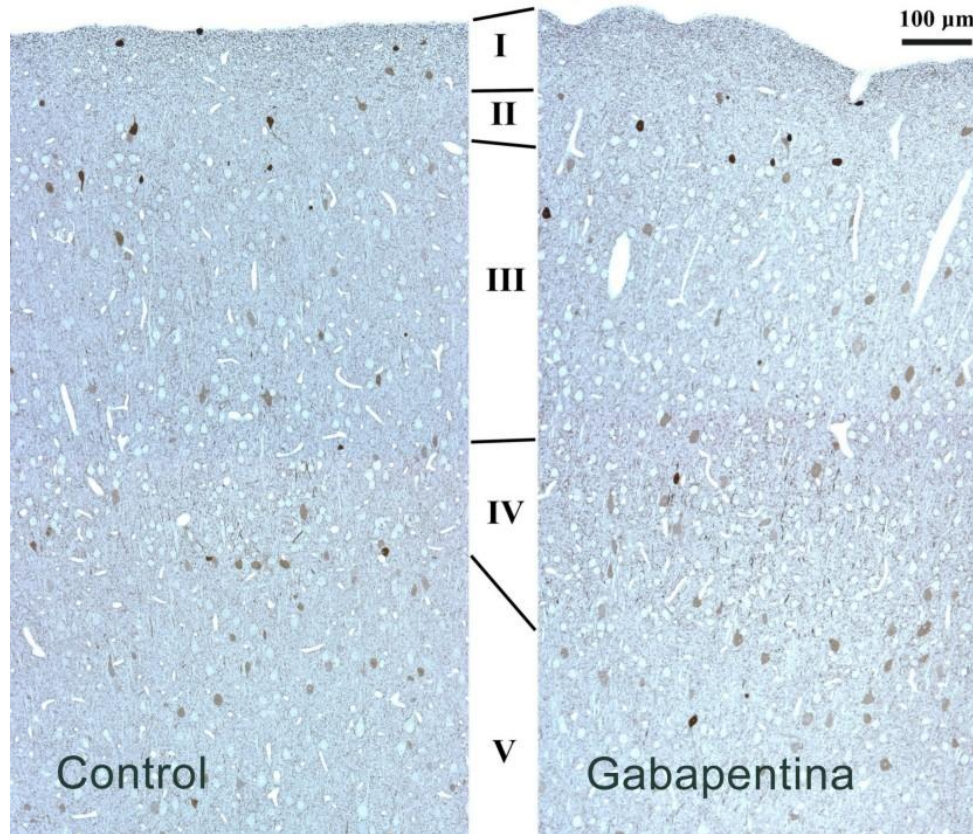


Figura 33. Inmunohistoquímica para GABA en la corteza cerebral. No se evidencia una clara disminución de la inmunorreactividad para GABA tras la administración de GBP.

Respecto a las neuronas glicinérgicas, su mayor densidad sigue encontrándose en el Vc, sin el claro gradiente rostrocaudal que se apreciaba para las neuronas gabaérgicas. Esta densidad neuronal se sigue de la encontrada en el Vip y posteriormente por la del Vp. La mayor variación de neuronas glicinérgicas se produce en el Vip con un descenso del 40,8% en el número total de neuronas, que se produce a expensas de las fuertemente marcadas. Descensos algo menores se evidencian en el Vp y en el Vc, a expensas de las fuertemente marcadas en el primer caso y de las dos en el segundo. Por su parte, respecto a las diferentes áreas del Vc no se produce un claro gradiente rostrocaudal en el descenso de la inmunorreactividad glicinérgica. La tabla 16 recoge la estimación de las neuronas glicinérgicas en los núcleos sensoriales del trigémino tras la administración de GBP. Todos los descensos en el número de neuronas fuertemente marcadas y para el total de ellas fueron estadísticamente significativos.

La figura 37 muestra la ausencia de diferencia en la inmunorreactividad gabaérgica del neuropilo entre los animales controles y los tratados con gabapentina.

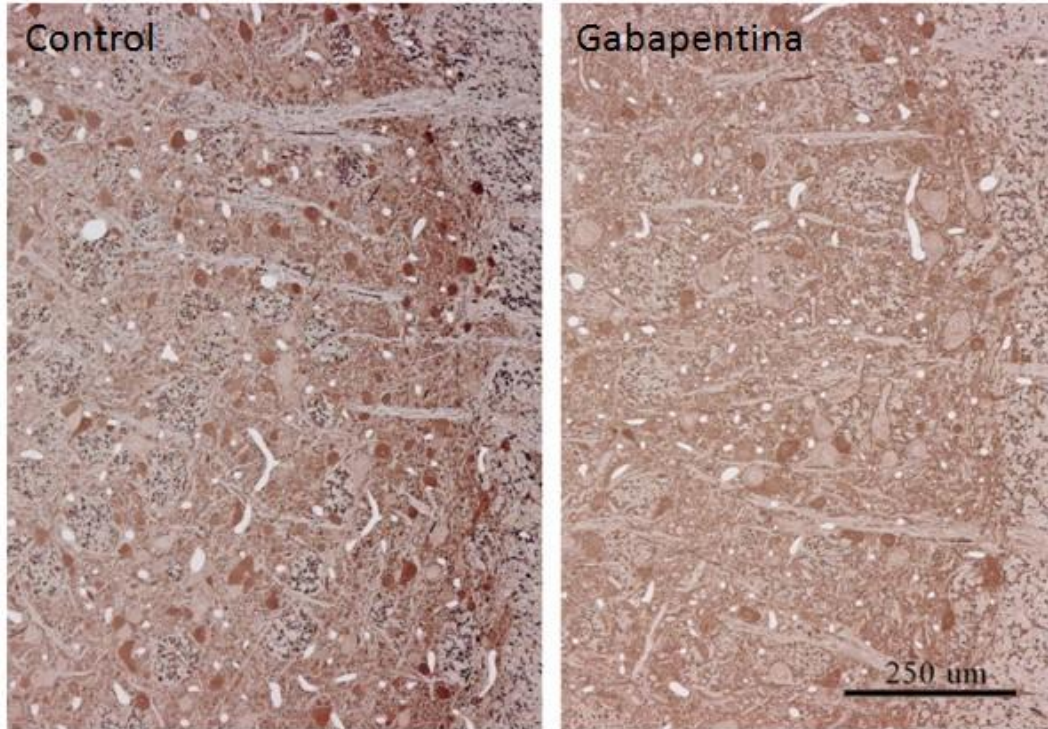


Figura 34. Inmunohistoquímica para glicina en el Vip. Se observa una clara disminución del marcaje neuronal en aquellos animales tratados con GBP respecto a los animales controles.

		Vc			Vip			Vp			CxSS		
		Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total
UPG1	D	3,48	4,29	7,77	2,04	2,79	4,83	0,37	6,95	7,32	2,73	2,73	5,46
	I	3,64	4,11	7,75	2,14	3,16	5,20	0,25	7,54	7,79	3,14	3,08	3,22
UPG2	D	2,89	4,17	7,06	-	-	-	0,37	6,07	6,44	2,45	2,78	5,23
	I	3,00	4,34	7,34	-	-	-	0,19	5,69	5,88	1,80	2,02	3,82
UPG3	D	3,79	2,54	6,33	-	-	-	0,05	3,99	4,04	3,60	1,65	5,25
	I	2,42	3,45	5,87	1,86	3,18	5,04	0,18	4,10	4,27	3,48	2,23	5,70
UPG4	D	3,15	2,34	5,49	-	-	-	0,13	5,05	5,18	3,43	2,69	6,12
	I	6,59	3,10	9,69	-	-	-	0,23	4,77	5,00	3,08	2,66	5,74
UPG5	D	4,70	2,67	7,36	-	-	-	0,38	4,34	4,72	3,40	2,04	5,43
	I	3,96	3,87	7,83	-	-	-	0,19	5,34	5,53	3,70	2,76	6,46
UPG6	D	2,36	3,01	5,37	-	-	-	0,16	6,30	6,46	3,77	1,69	5,46
	I	-	-	-	-	-	-	0,24	4,86	5,11	3,30	2,22	5,52
	Media_a	3,64	3,44	7,08	2,01	3,01	5,02	0,24	5,42	5,66	3,16	2,38	5,54
est Nv	CV_a	0,33	0,22	0,18	0,07	0,06	0,04	0,47	0,21	0,21	0,18	0,20	0,12
	CE_a	0,014	0,026		0,021	0,046		0,071	0,027		0,016	0,027	
	est N_b	12,46	11,78	24,24	4,83	7,23	12,06	0,30	6,68	6,98			
	% Var	-47,9%	+1,6%	-31,7%	-26,4%	-13,1%	-24,2%	-69,9%	-28,0%	-32,0%	-1,7%	+5,5%	+1,1%

Tabla 15. Estimación de las neuronas gabaérgicas en los núcleos sensoriales del trigémino y en la CxSS tras la administración de GBP.

Densidad numérica (Nv, en miles/mm³) y número total de neuronas (N, en miles). No corregido^a, y corregido^b, para el encogimiento del tejido. % Var: porcentaje de variación respecto al grupo control.

		Vc			Vip			Vp		
		Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total
UPG1	D	9,1	3,9	13,0	5,1	3,6	8,7	3,0	5,6	8,6
	I	–	–	–	4,5	5,9	10,5	–	–	–
UPG2	D	6,7	3,6	10,3	4,4	3,5	7,9	4,0	5,6	9,6
	I	6,3	3,1	9,4	-	-	-	2,8	4,9	7,7
UPG3	D	7,8	2,6	10,4	-	-	-	3,5	3,7	7,2
	I	7,0	3,5	10,5	-	-	-	3,3	4,1	7,4
UPG4	D	6,4	2,5	8,9	-	-	-	4,0	4,1	8,1
	I	7,6	3,0	10,6	-	-	-	3,5	3,8	7,3
UPG5	D	5,9	2,9	8,8	-	-	-	3,0	4,7	7,7
	I	6,1	2,8	8,9	-	-	-	3,7	3,8	7,5
UPG6	D	7,3	3,7	11,0	-	-	-	2,2	4,7	6,9
	I	6,8	3,1	9,9	-	-	-	2,1	5,3	7,4
	<i>Media_a</i>	7,0	3,2	10,2	4,7	4,3	9,0	3,2	4,6	8,0
est N _v	<i>CV_a</i>	0,15	0,15	0,17	0,08	0,32	0,14	0,14	0,19	0,12
	<i>CE_a</i>	0,013	0,029		0,017	0,011		0,031	0,023	
	est N _b	23,96	10,95	34,92	11,29	10,33	21,62	3,64	5,66	9,61
	<i>% Var</i>	-35,2%	-13,5%	-30,1%	-55,2%	-8,5%	-40,8%	-58,9%	-6,1%	-37,5%

Tabla 16. Estimación de las neuronas glicinérgicas en los núcleos sensoriales del trigémino tras la administración de GBP. Densidad numérica (N_v, en miles/mm³) y número total de neuronas (N, en miles). No corregido^a, y corregido^b, para el encogimiento del tejido. % Var: porcentaje de variación respecto al grupo control.

		Vc(c)			Vc(i)			Vc(r)		
		Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total
UPG1	D	4,70	4,70	9,40	–	–	0,00	3,10	3,80	6,90
	I	4,84	6,74	11,58	4,16	4,48	8,64	3,13	3,81	6,94
UPG2	D	3,49	5,34	8,83	3,61	5,02	8,63	2,08	2,95	5,03
	I	2,73	3,76	6,49	2,69	3,54	6,23	3,37	5,16	8,53
UPG3	D	5,48	3,49	8,97	4,96	2,54	7,50	2,59	1,89	4,48
	I	2,63	3,64	6,27	2,71	3,46	6,17	1,62	3,04	4,66
UPG4	I	8,63	3,08	11,71	6,38	3,00	9,38	5,75	3,18	8,93
UPG5	D	6,88	3,81	10,69	3,35	2,19	5,54	4,32	2,52	6,84
	I	3,90	5,14	9,04	4,08	4,55	8,63	2,08	3,06	5,14
UPG6	D	2,38	2,16	4,54	2,38	3,30	5,68	2,33	3,23	5,56
	Media	4,57	4,19	8,75	3,81	3,56	7,38	3,12	3,27	6,38
<i>est N_v</i>	CV	0,24	0,31	0,21	0,25	0,31	0,49	0,17	0,37	0,26
	CE	0,022	0,043		0,022	0,046		0,025	0,042	
	% Var	-59,2%	-15,3%	-45,7%	-46,9%	3,3%	-30,6%	-33,4%	30,4%	-11,2%

Tabla 17. Estimación de las neuronas gabaérgicas en las distintas áreas del Vc del trigémino tras la administración de GBP. Densidad numérica (N_v , en miles/mm³) para un volumen no corregido. D: lado derecho; I: lado izquierdo. % Var: porcentaje de variación respecto al grupo control.

		Vc(c)			Vc(i)			Vc(r)		
		Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total
UPG1	D	10,23	4,47	14,70	12,49	3,18	15,67	6,10	4,01	10,11
UPG2	D	6,48	3,84	10,32	7,01	3,78	10,79	6,66	3,33	9,99
	I	5,76	3,10	8,86	6,85	3,27	10,12	6,15	3,07	9,22
UPG3	D	9,32	3,11	12,43	7,67	2,24	9,91	7,48	2,76	10,24
	I	6,74	4,21	10,95	7,69	3,14	10,83	6,63	3,36	9,99
UPG4	I	6,37	2,06	8,43	6,31	2,66	8,97	9,38	3,94	13,32
UPG5	D	6,57	3,75	10,32	5,29	2,09	7,38	6,09	3,17	9,26
	I	6,56	2,42	8,98	7,38	3,61	10,99	4,97	2,35	7,32
	Media	7,25	3,37	10,62	7,59	3,00	10,58	6,68	3,25	9,93
<i>est</i>	CV	0,27	0,19	0,21	0,31	0,19	0,23	0,08	0,14	0,04
<i>N_v</i>	CE	0,016	0,039		0,026	0,042		0,022	0,043	
	% Var	-36,7%	-18,4%	-31,8%	-26,5%	-19,6%	-24,7%	-31,8%	-18,2%	-27,9%

Tabla 18. Estimación de las neuronas glicinérgicas en las distintas áreas del Vc del trigémino tras la administración de GBP. Densidad numérica (N_v , en miles/mm³) para un volumen no corregido. D: lado derecho; I: lado izquierdo. % Var: porcentaje de variación respecto al grupo control.

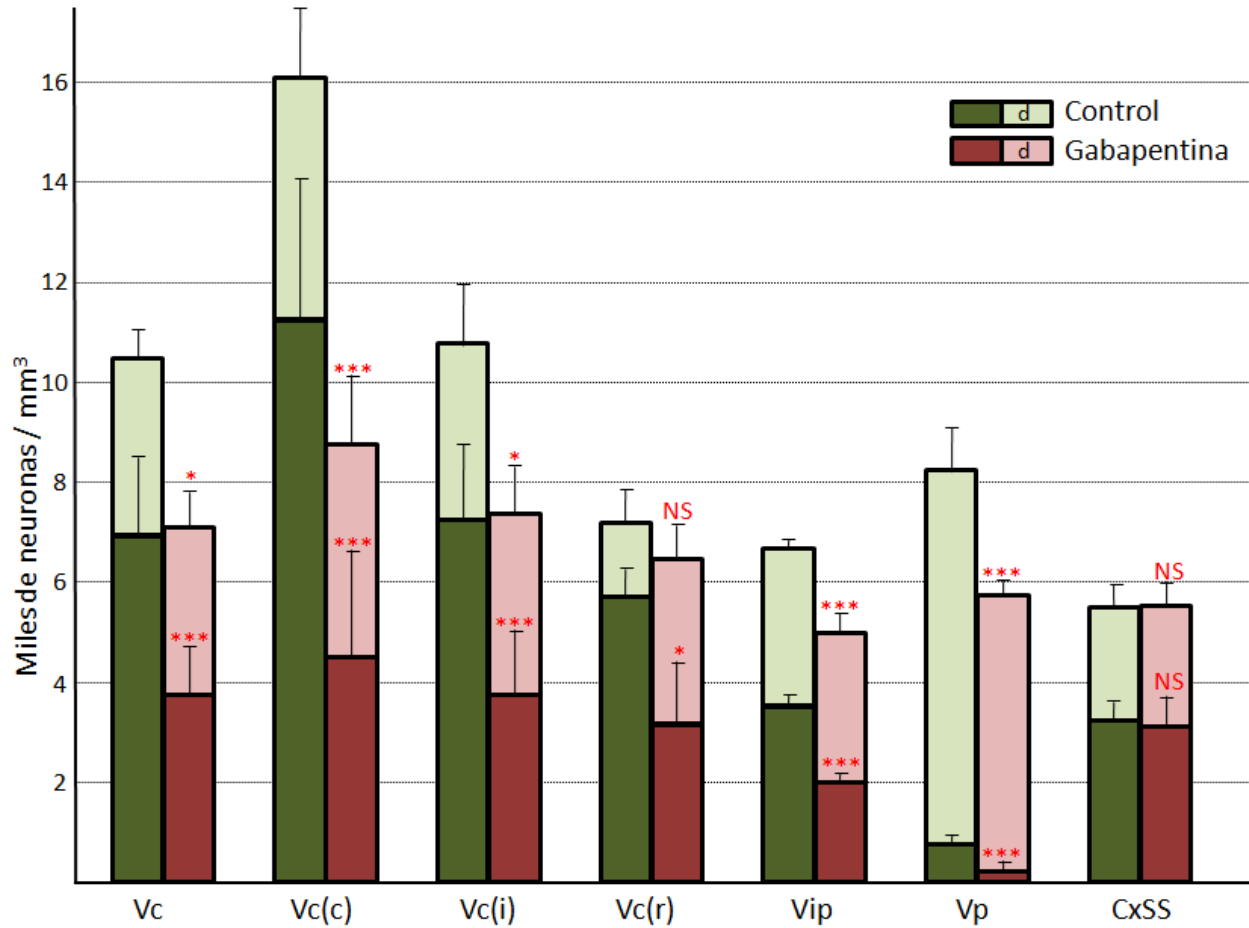


Figura 35. Respuesta de las neuronas gabaérgicas de los núcleos del trigémino y de la corteza cerebral tras la inyección de GBP. Se aprecia un claro descenso en el número de neuronas gabaérgicas fuertemente marcadas y el total de ellas para todos los núcleos del trigémino. Respecto a las diferentes regiones del núcleo Vc se comprueba que el mayor descenso tiene lugar en los niveles más caudales, para ser un descenso menor en los niveles intermedios y apenas evidenciarse descenso en la inmunorreactividad para GABA en la región más rostral. De hecho en esta región sólo se evidencia un descenso significativo de las neuronas fuertemente marcadas no apreciándose significación estadística para el descenso en el número total de neuronas. Los asteriscos indican el grado de significación estadística (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; NS: no significativo). La fila superior indica la significación estadística para el número total de neuronas gabaérgicas mientras que la fila inferior indica la significación estadística de las neuronas fuertemente marcadas. No se objetiva un descenso de las neuronas gabaérgicas de la corteza cerebral tras la administración de GBP.

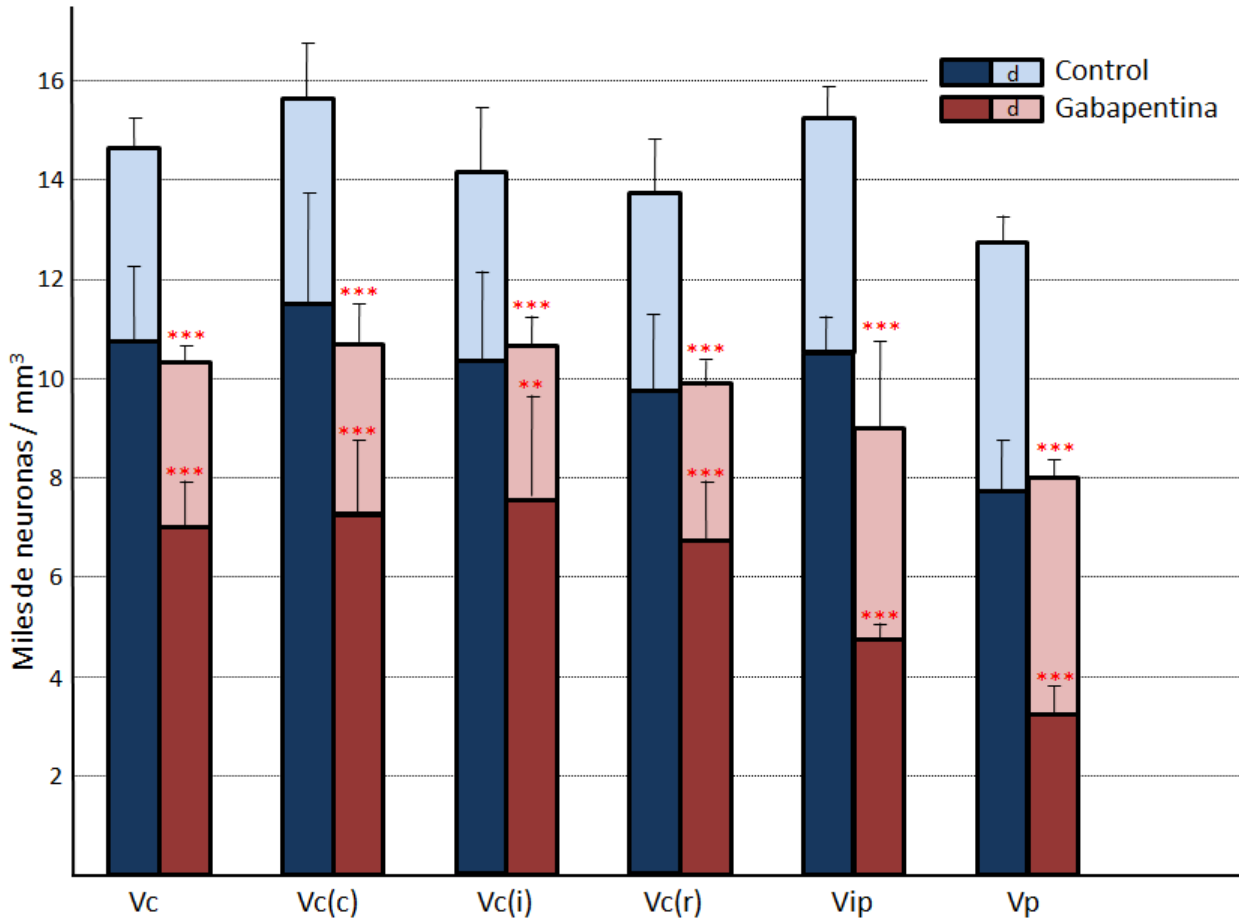


Figura 36. Respuesta de las neuronas glicinérgicas de los núcleos del trigémino tras la inyección de GBP. Se aprecia un claro descenso en el número de neuronas glicinérgicas fuertemente marcadas y el total de ellas para todos los núcleos del trigémino. Respecto a las diferentes regiones del núcleo Vc se comprueba un descenso similar en todos los niveles a diferencia de lo que sucedía en con la inmunorreactividad gabaérgica. Los asteriscos indican el grado de significación estadística (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; NS: no significativo). La fila superior indica la significación estadística para el número total de neuronas glicinérgicas mientras que la fila inferior indica la significación estadística de las neuronas fuertemente marcadas.

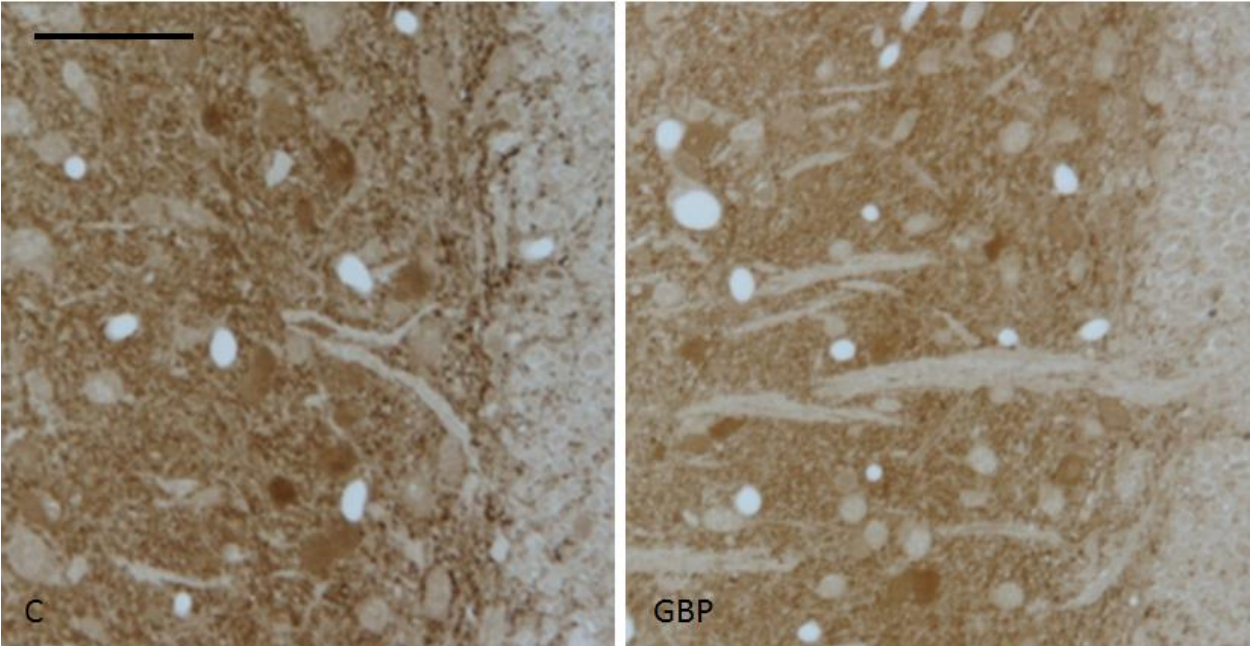


Figura 37. Comparación del neuropilo entre los animales controles y los animales tratados con GBP. Se observa una similitud en la inmunorreactividad para GABA. Barra de escala = 100 μ m.

4.3.3 Respuesta de las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas tras la CCI-IoN y administración de GBP

El comportamiento nociceptivo de las ratas a las que se realiza una CCI-IoN y se les administra GBP es muy similar al de los animales a los que no se les administra este fármaco. En estos animales también se evidencia una marcada hipersensibilidad a los estímulos mecánicos en el territorio del nervio ligados respecto al lado control. El período inicial de anestesia también es similar al de los animales en los que únicamente se lleva a cabo la CCI y como ha sido publicado en otros estudios anteriormente (Christensen et al., 1999; Idänpää-Heikkilä y Guilbaud, 1999). La figura 38 muestra la conducta algésica de estos animales.

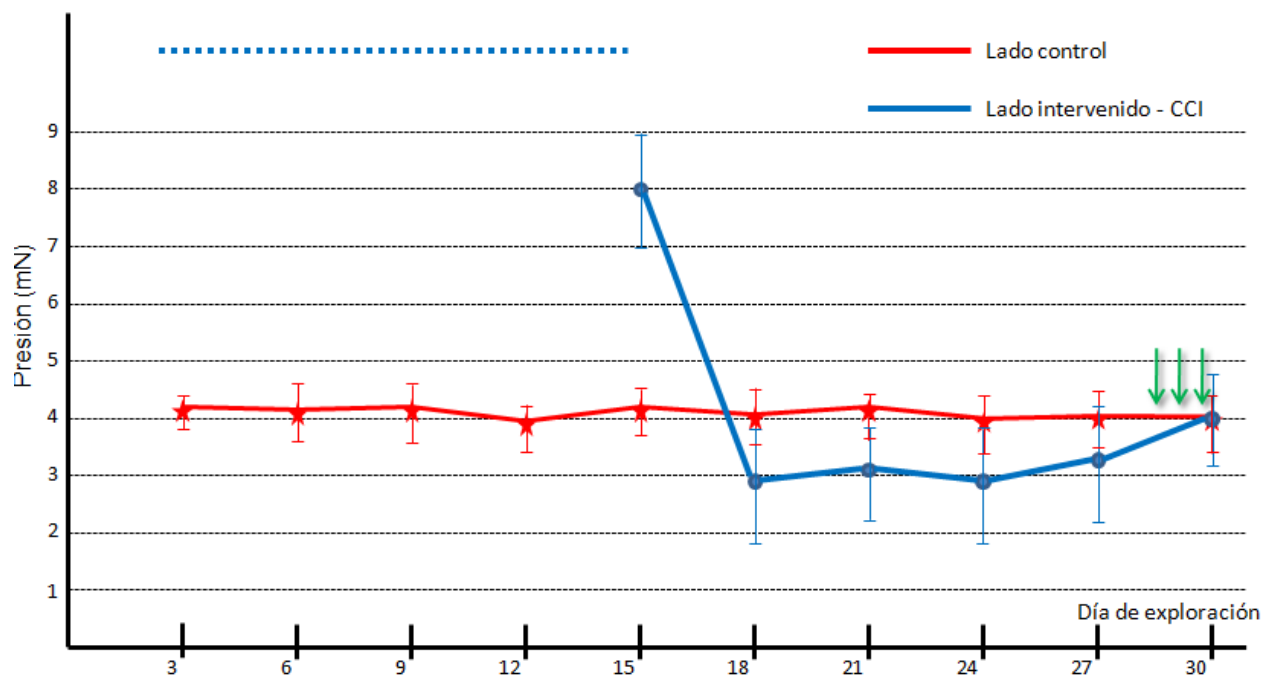


Figura 38. Conducta algésica de los animales intervenidos mediante CCI y tratados con GBP. Se representa el lado control (siempre el derecho) frente al lado intervenido (siempre el izquierdo). La línea discontinua en azul representa el período de anestesia completa típica de los primeros 15 días tras la cirugía. Las flechas verdes representan los días en los que se administra la GBP.

Tras la administración de GBP se observa una disminución en la expresión de neuronas gabaérgicas y glicinérgicas significativa ($P < 0,001$) en el Vc, tanto en el lado intervenido como en el lado control. En ambos casos, esta disminución se produce para las neuronas fuertemente marcadas.

En la CxSS no se evidencia ninguna reducción de las neuronas gabaérgicas ni para el total de neuronas ni para las neuronas fuertemente marcadas. Esta ausencia de modificación se mantiene tanto en el lado intervenido como en el lado control.

Las tablas 19 y 20 muestran una estimación de las neuronas gabaérgicas en el Vc y sus distintas regiones y en la CxSS tras la realización de una CCI. Por su parte la figura 39 muestra la variación de estas estructuras respecto al grupo control y el estudio estadístico realizado.

LADO INTERVENIDO	Vc (Izquierdo)			CxSS (Derecha)		
	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total
UPIG1	4,00	3,70	7,70	3,20	2,40	5,60
UPIO1	3,30	3,10	6,40	2,90	2,10	5,00
UPIO2	3,90	3,20	7,10	3,10	3,00	6,10
<i>Media_a</i>	3,73	3,33	7,07	3,07	2,50	5,57
<i>est N_v</i> <i>CV_a</i>	0,10	0,10	0,09	0,05	0,18	0,10
<i>CE_a</i>	0,016	0,024		0,010	0,016	
<i>est N_b</i>	12,80	11,40	24,17			
<i>% Var</i>	-46,6%	-1,5%	-31,8%	-5,5%	+10,1%	+1,1%
LADO CONTROL	Vc (Derecho)			CxSS (Izquierda)		
	Fuertes	Débiles	Total	Fuertes	Débiles	Total
UPIG1	4,10	3,80	7,90	3,30	2,10	5,40
UPIO1	3,20	2,90	6,10	3,00	2,50	5,50
UPIO2	3,70	3,00	6,70	2,80	2,80	5,60
<i>Media_a</i>	3,67	3,23	6,90	3,03	2,47	5,50
<i>est N_v</i> <i>CV_a</i>	0,12	0,15	0,13	0,08	0,14	0,02
<i>CE_a</i>	0,018	0,028		0,016	0,024	
<i>est N_b</i>	12,56	11,06	23,62			

Tabla 19. Estimación de las neuronas gabaérgicas en el Vc y en la CxSS tras la realización de una CCI y administración de GBP. Se representan por separado el lado control y el intervenido. Densidad numérica (N_v, en miles/mm³) y número total de neuronas (N, en miles). No corregido^a, y corregido^b, para el encogimiento del tejido. % Var: porcentaje de variación respecto al grupo control.

		<i>Vc (Intervenido)</i>			<i>Vc (Control)</i>		
		Fuertes	Débiles	<i>Total</i>	Fuertes	Débiles	<i>Total</i>
UPIG1		5,70	2,60	8,30	5,40	3,50	8,90
UPIO1		7,30	3,40	10,70	7,40	3,30	10,70
UPIO2		7,40	2,70	10,10	6,90	3,10	10,00
	<i>Media</i>	6,80	2,90	9,73	6,80	2,93	9,73
<i>est Nv</i>	<i>CV</i>	0,14	0,15	0,13	0,14	0,14	0,13
	<i>CE</i>	0,019	0,031		0,018	0,027	
	<i>est N²</i>	23,28	9,92	33,20	23,28	10,03	33,31
	<i>% Var</i>	-37,0%	-21,6%	-33,3%	-37,0%	-20,8%	-33,3%

Tabla 20. Estimación de las neuronas glicinérgicas en el Vc tras la realización de una CCI y administración de GBP. Se representan por separado el lado control y el intervenido. Densidad numérica (Nv, en miles/mm³) y número total de neuronas (N, en miles). No corregido^a, y corregido^b, para el encogimiento del tejido. % Var: porcentaje de variación respecto al grupo control.

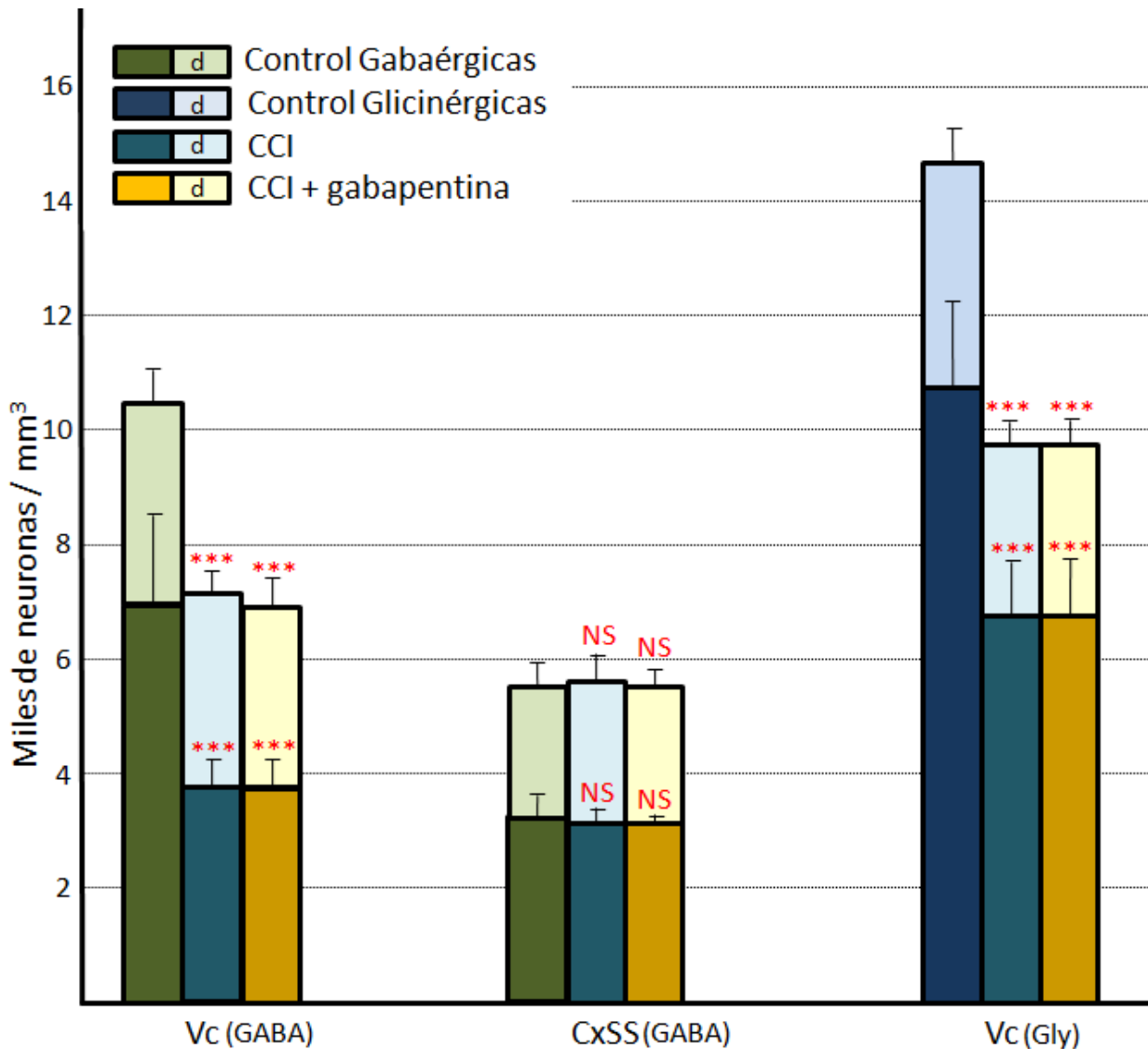


Figura 39. Respuesta de las neuronas gabaérgicas y glicinérgicas de los núcleos del trigémino y en la corteza cerebral tras la realización de una CCI y la administración de GBP. Se aprecia una clara disminución en el número de neuronas gabaérgicas y glicinérgicas en el Vc, tanto para las neuronas fuertemente marcadas como para el total. Estos resultados son similares a los obtenidos únicamente al tratar con GBP. Los asteriscos indican el grado de significación estadística (* $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$; NS: no significativo).

5. DISCUSIÓN

5.1 CONSIDERACIONES SOBRE MÉTODOS Y DISEÑOS UTILIZADOS

5.1.1 Sobre los animales de experimentación

Se han utilizado ratas adultas jóvenes, con una edad comprendida entre 3 y 4 meses. Existe una diferencia promedio de un mes en la edad en la que los animales son sacrificados entre los grupos en los que se desarrolla CCI y en los que no, debido a que tras el desarrollo de la cirugía, los animales deben mantenerse vivos durante un mes para llevar a cabo las exploraciones comentadas.

Por otro lado, para evitar los cambios de comportamiento o un posible estrés provocados por la presencia de hembras en los períodos receptivos, se seleccionaron únicamente machos para este estudio. Además, con este hecho, también se evitaron las posibles interferencias del ciclo estral.

5.1.2 Marcado de las neuronas de proyección trigeminotalámicas y trigeminocerebelosas

La HRP es probablemente el trazador neuronal retrógrado no específico más fiable y disponible, del cual existe una amplia experiencia de utilización y una gran cantidad de trabajos publicados (Mesulam, 1978; Bermejo et al., 2003). No se examinó cuantitativamente si la contratinción con tiónina de las secciones en las que se reveló la HRP pudiese interferir con el marcaje del trazador. Sin embargo, la inspección de series paralelas de HRP con y sin contratinción con tiónina no mostraba una diferencia detectable en el marcado. Las mayores diferencias existentes en la expresión del trazador estaban en relación a la extensión y en la localización de la inyección. La amplia inyección realizada (dos inyecciones por tres alturas con 0,2 µl de solución en cada depósito) nos hace pensar que la inyección talámica cubrió todos los sitios de terminación de las fibras trigeminotalámicas. Es más difícil asegurar que las inyecciones en el cerebelo afectaron a todas las terminaciones trigeminocerebelosas, debido a que la distribución de las mismas es mayor. Sin embargo, existen dos hechos que llevan a pensar que esto sí fue así; por un lado, las inyecciones se distribuyeron a lo largo de todas las regiones corticales cerebelosas que se sabe reciben proyecciones desde el complejo trigeminal y, por otro lado, el trazador se liberó en las capas profundas del cerebelo, afectando presumiblemente a una gran cantidad de folias cerebelosas así como a las fibras aferentes procedentes del pedúnculo inferior cerebeloso. Se obtuvo una fuerte reacción para HRP a lo largo del todo

el cerebelo, con la excepción de la región más lateral de los lóbulos y la región posterior del vermis, lo que augura un marcado casi completo de las proyecciones trigeminocerebelosas.

5.1.3 Modelo de CCI-IoN

El modelo de CCI utilizado está basado en el modelo clásico de Vos et al (1994). Este modelo se utilizó como una mera herramienta para estudiar la expresión de neurotransmisores inhibitorios y no para caracterizar sus propiedades o analizar con más detalle la conducta nociceptiva generada. No obstante, es preciso tener en cuenta que una serie de limitaciones pueden influir el desarrollo de dolor neuropático buscado y por tanto, es posible que también sobre la neurotransmisión inhibitoria consiguiente. Estas limitaciones serían las siguientes:

- **Número de ligaduras.** Si bien el número de ligaduras utilizadas en el modelo clásico era de dos, otros modelos de dolor neuropático desarrollados en otros nervios utilizan más (Bennett y Xie, 1988). A diferencia de la técnica utilizada en esta Tesis Doctoral, estos modelos únicamente realizaban las ligaduras alrededor del IoN tratado de forma global y no diferenciando sus diferentes fascículos, como se ha realizado en esta Tesis.
- **Material utilizado en las ligaduras.** Mientras que el modelo clásico tiende a utilizar catgut crómico como material de sutura, en esta Tesis se han realizado con seda trenzada. El catgut crómico no provoca únicamente una constricción del IoN sino también una ligera inflamación local (Stewart et al., 1990; Uff et al., 1995), con lo que no se pueden aislar los efectos de la constricción. En nuestro caso utilizamos seda trenzada en lugar de catgut crómico, de tal modo que los efectos neuropáticos obtenidos serían explicados exclusivamente por la compresión del nervio y se evitaría el componente de inflamación local de origen químico que aparece con otro tipo de materiales como el previamente descrito.

En algunos de nuestros estudios piloto sin embargo utilizaremos catgut crómico; y en ellos observamos una serie de deficiencias respecto a los modelos de CCI-IoN realizados con seda trenzada, como una mayor dificultad para la realización de la ligadura, una duración menor de la respuesta algésica en los animales y la ausencia de diferencias marcadas entre el lado control y el lado intervenido. Además, al ser reabsorbibles, estas suturas no parecían mantenerse durante el mes de supervivencia de la rata, lo que daba lugar a una constricción difícilmente cuantificable. Los estudios piloto con polipropileno (Prolene®) no mostraron

- diferencias importantes respecto a la seda trenzada, por lo que finalmente se decidió utilizar esta última.
- **Presión de las ligaduras sobre el nervio.** La presión ejercida sobre el IoN se realizó en base a los modelos anteriores (Bennett y Xie, 1988), según los cuales, intentaban reducir el diámetro del nervio hasta que la circulación superficial se retrasase pero no se ocluyese. Sin embargo, este grado de constricción óptimo es difícil de lograr por lo que es posible que hayan existido diferencias de presión no cuantificables entre nuestro modelo de CCI-IoN y los previamente descritos, así como entre los diferentes animales intervenidos en nuestro estudio. En definitiva, se trata de una variable difícilmente cuantificable y muy dependiente de la experiencia del cirujano.
 - **Punto de colocación de las ligaduras.** Si bien está claro que las ligaduras deben asentar en el IoN, no queda claro el punto exacto en el que estas deben colocarse. En nuestro caso, se colocó una primera ligadura en la región del nervio lo más proximal posible y otra en la región distal justo proximal a la división de los fascículos del nervio en las múltiples ramas destinadas a introducirse en la dermis y recoger la sensibilidad cutánea.
 - **Ausencia de grupo control (“sham”).** Otra de las limitaciones de la cirugía es la ausencia de un grupo control en el cual se desarrolle la misma cirugía sin desarrollar una constricción del nervio. Esto impide saber si los resultados en el comportamiento de los animales son debidos a la constricción del nervio o al resto de la intervención quirúrgica (apertura de la piel, separación del IoN del tejido conjuntivo circundante, fresado del hueso cigomático...). En cualquier caso, esas manipulaciones habrían contribuido presumiblemente al incremento de la respuesta nociceptiva.

Otro de los puntos donde existen limitaciones es en la exploración de los animales. Si bien, el estudio de las respuestas evocadas se realizó siguiendo una rutina lo más similar posible entre una y otra exploración, no siempre es posible aislar a los animales del resto de influencias externas y realizar los mismos movimientos. Además, el estado de los animales no tiene por qué ser siempre el mismo antes de realizar una determinada exploración. Todo ello puede explicar las diferencias en los datos obtenidos en las exploraciones intra- e interanimales.

La evaluación de los animales estudiados únicamente se centró en la retirada ante determinados estímulos para analizar el umbral algésico de los territorios explorados. Sin embargo, otros tipos de comportamientos como los actos de acicalamiento (“grooming”)

facial, el descenso de la actividad exploratoria, el aumento del tiempo en actitudes inmóviles o la pérdida de peso no se analizaron de forma cuantitativa a pesar de haber sido descritos en otros modelos de dolor neuropático.

En el modelo de CCI realizado en esta Tesis, se consigue una clara anestesia en las primeras dos semanas simulando al modelo clásico. Sin embargo, en la segunda fase, aunque se obtiene un claro descenso del umbral nociceptivo y una clara alodinia, los resultados parecen ser inferiores a los descritos en el modelo clásico, lo que permite cuestionar la ventaja aparente del uso de las ligaduras plurifasciculares.

5.1.4 Tratamiento con GBP

Las dosis empleadas y el modo de tratamiento de GBP están en consonancia con otros estudios en modelos animales de dolor (Back et al., 2004; Emmez et al., 2010). Sin embargo, estas dosis utilizadas en rata no son comparables a las utilizadas en humanos, ni en cuanto a la dosis diaria, ya que la dosis máxima en humanos es de 3.600 mg al día ni en cuanto a la duración del tratamiento, que es crónico (Backonja y Glanzman, 2003). Por ello, los resultados obtenidos en estos modelos animales tienen una utilidad limitada al extrapolar su utilidad en patologías con dolor neuropático en humanos.

No exploramos los posibles efectos sedativos de la GBP sobre la actividad espontánea o inducida por estímulos. Aunque probables, no fueron suficientes para producir efectos obvios o a la mera observación.

5.1.5 Inmunohistoquímica para GABA y glicina

La elección de la inmunocitoquímica postinclusión en cortes semifinos se debió a que la penetración de los anticuerpos frente a GABA y glicina en este tejido fijado con glutaraldehído (Ottersen y Storm-Mathisen, 1984). En las secciones más gruesas, la escasa penetración de estos anticuerpos es una causa de un descenso de marcado en las zonas más internas del tejido y de un sesgo en la estimación del número de células (Avendaño, 2005). El marcaje neuronal mostró una gradación suave a lo largo de un amplio rango, sin claras separaciones entre las células levemente positivas y las células negativas, así como entre las células clasificadas como fuertemente inmunorreactivas y las débilmente inmunorreactivas. Rangos similares para la intensidad del marcaje de GABA y glicina se han descrito para los núcleos auditivos del tronco del encéfalo en ratas y monos (Moore et al., 1996; Riquelme et al., 2001). Las dificultades de cuantificación derivadas

de este hecho se limitaron mediante dos estrategias diferentes: 1) relacionando la intensidad del marcaje con el rango real de una determinada preparación entre el máximo (obtenido de las células y el neuropilo de mayor intensidad de marcado) y el mínimo (obtenido del soma de las células gliales y de los somas y dendritas que eran negativas de un modo incuestionable), y 2) estableciendo unos criterios que pudiesen asignar las células a una escala cualitativa de un modo consistente y repetible y comprobados mediante un análisis densitométrico (ver Materiales y Métodos).

Los anticuerpos utilizados son muy específicos para los respectivos aminoácidos en el tejido fijado con glutaraldehído (Matute y Streit, 1986; Spirou y Berrebi, 1997) asegurando una mínima, en caso de que exista, reactividad cruzada entre el GABA y la glicina. Esto está apoyado por el hecho de que existan algunas neuronas fuertemente positivas para GABA que son negativas para glicina y viceversa. Por lo tanto, incluso bajos niveles de inmunorreactividad para uno de los aminoácidos son indicativos de su presencia en estas células. Ya que el GABA juega un papel preferente como neurotransmisor, es probable que incluso un nivel bajo de inmunorreactividad para GABA revele la naturaleza gabaérgica de la célula. Sin embargo, un nivel bajo de inmunorreactividad para glicina podría simplemente reflejar la presencia de este aminoácido en las reacciones metabólicas de la célula (Ottersen et al., 1988).

5.1.6 Estereología

5.1.6.1 Estudio morfométrico y de proyecciones

Los métodos estereológicos utilizados en el estudio morfométrico y de proyecciones (estimador de Cavalieri y fraccionador óptico) son herramientas estadísticas y geométricas insesgadas y altamente eficientes, las cuales además nos permiten evaluar la precisión de las estimaciones obtenidas con ellas (Gundersen et al., 1988). Sin embargo, el material biológico procesado al cual son aplicadas generalmente contiene distorsiones espaciales importantes, las cuales se deben tener en cuenta a la hora de diseñar el protocolo de cuantificación y la obtención de los resultados (Avendaño, 1996; Blasco et al., 1999; Dorph-Petersen et al., 2001; Guillery, 2002).

En nuestro material, existen tres causas principales que pueden provocar estas distorsiones, dos de las cuales se originan de las deformaciones anisotrópicas soportadas por el tejido tras el sacrificio y la perfusión de los animales y la preparación del tejido. Uno es el efecto de los diferentes fijadores y de las diferentes reacciones histoquímicas

sobre las estimaciones del volumen. Se ha estimado que el volumen del tronco del encéfalo tras la perfusión-fijación, utilizando un 4% de paraformaldehído en búffer fosfato 0,1M y medido mediante desplazamiento de un volumen de agua, fue esencialmente el mismo que el volumen estimado mediante el método de Cavalieri en secciones seriadas de 50 μm de espesor obtenidas mediante vibratomo (Bermejo et al., 2003). En contraste con esto, el protocolo de fijación utilizado en las ratas a las que se les inyectó HRP produjo un marcado encogimiento respecto a las secciones de Nissl. Este encogimiento se incrementó hasta un 30% en el tejido en el que se reveló la HRP y se contratiñó con tionina. Estas comparaciones en el encogimiento del tejido se recomienda realizarlas mediante las medidas del área ya que el encogimiento lineal es sustancialmente diferente a lo largo y a lo ancho de la dirección del corte. Por su lado, a lo largo del eje rostrocaudal no se detectaron diferencias, al menos para el tronco del encéfalo.

El segundo problema surge de las medidas del espesor de las secciones y del encogimiento vertical de las secciones montadas, cuya contribución a los errores de cuantificación ha sido objeto de un renovado interés en los últimos años (Dorph-Petersen et al., 2001; Guillery, 2002). Las secciones cortadas tanto en vibratomo como en micrótopo de congelación muestran una variabilidad en el encogimiento en las distintas secciones. Además, estas secciones tienen superficies superiores o inferiores irregulares, las cuales son responsables de variaciones en el espesor de cada una de las secciones. El espesor medio de cada sección se obtuvo a partir de varias lecturas del “*microcator*”, enfocando los bordes superior e inferior del tejido con la lente de inmersión en diversas locaciones seleccionadas al azar del complejo trigeminal. Sin embargo, la deformación vertical irregular de las diferentes secciones hace que para un “cubo” del disector óptico introducido en el tejido, la altura real, que representa la altura de ese cubo, sea mayor en un corte que esté más encogido que en uno que no lo esté. Para compensar esta variación, Dorph-Petersen et al. (2001) propuso ponderar el espesor de las secciones individuales por el recuento del número de neuronas y usar la altura para computar la fracción de muestra de la altura. Nosotros hemos propuesto una variante menos exigente y de más fácil ejecución, con iguales efectos correctivos (Bermejo et al., 2003).

El tercer problema resulta de las inconsistencias en el reconocimiento de las unidades de conteo. Esta situación puede ser debida a un deficiente marcaje de Nissl o a la presencia de dificultades en el reconocimiento de los núcleos en las neuronas fuertemente marcadas para HRP, particularmente en áreas con densos agregados de células marcadas. Por otro lado, es posible que pequeñas neuronas escasamente teñidas para Nissl y no marcadas para HRP no se llegasen a identificar en zonas con acumulación de neuronas fuertemente

marcadas. Esto podría ser una fuente de error en la cuantificación, aunque en caso de existir, sería pequeña.

5.1.6.2 Cuantificación de interneuronas gabaérgicas y glicinérgicas

El encogimiento del tejido derivado de la inclusión en resina fue importante para la estimación del número de neuronas utilizando el disector físico en pares de cortes semifinos. Como se describió en los resultados, este encogimiento se estimó en 12%, el cual se utilizó para corregir el número total de neuronas inmunorreactivas para GABA y/o glicina. Para estimar el encogimiento en este material, las mediciones de área se compararon entre las secciones obtenidas mediante vibratomo y las incluidas en resina. Otros cambios adicionales de las dimensiones, derivados de la perfusión de los animales y la fijación y la postfijación del tejido no fueron evaluadas y, por lo tanto, no se tuvieron en cuenta. En caso de existir, probablemente estos cambios serían de pequeña magnitud, ya que a la simple inspección visual de estos cerebros no se objetivó una diferencia apreciable con los cerebros fijados únicamente con paraformaldehído.

Las medidas del espesor de los cortes semifinos son más difíciles de obtener que las de cortes más gruesos. Sin embargo, una estimación directa del espesor medio de una serie de secciones semifinas no es en realidad difícil de obtener (Gundersen, 1986) y puede eliminar la incertidumbre de lo que podría ser una fuente de error. Una serie de 100 secciones de un bloque de resina, cortadas en nuestro ultramicrotomo con una cuchilla de cristal a un espesor nominal de 1 μm , produjo un espesor total de 103 μm , medido mediante un *microcator* y utilizando una lente de 20X.

El “ruido” introducido por el método de muestreo y cuantificación (estimada mediante el CE) representó una proporción razonablemente baja de la varianza total en la mayoría de los casos. Estos datos indican que la variabilidad observada entre los sujetos representa de forma bastante aproximada la variabilidad biológica real, con una escasa contribución de los errores de medida (West et al., 1991).

5.2 NÚCLEOS SENSITIVOS TRIGEMINALES Y NÚMERO DE NEURONAS

5.2.1 Volúmenes de los subnúcleos del complejo trigeminal

A excepción de los datos publicados por nuestro grupo (Avendaño et al., 2005), que derivan buena parte del material utilizado en esta Tesis, no existen estudios sobre el

tamaño y el número total de neuronas de los subnúcleos sensitivos del complejo trigeminal. A modo de comparación, el volumen del Vp, Vo y Vip se estimó también sobre los diagramas del atlas de Paxinos y Watson (1998) del cerebro de rata. Estos diagramas se basan fundamentalmente en secciones teñidas con Nissl y acetilcolinesterasa de cerebros congelados y no fijados de ratas Wistar adultas jóvenes. Los volúmenes estimados de este modo difieren ligeramente de los presentados en este estudio para el Vp (+8%) y moderadamente para Vo y Vip (-15% y +17% respectivamente), los cuales coinciden con los presentados anteriormente por nuestro grupo (Avenidaño et al., 2005). La delineación del Vc es necesariamente arbitraria en su extremo caudal ya que este termina mezclándose con el asta posterior de la médula espinal en los segmentos cervicales superiores. Si bien no está claro el punto en el que termina el Vc, se conoce que al menos llega hasta el segmento C2 y que por debajo de este nivel las aferencias primarias del ganglio trigeminal son más escasas (Marfurt y Rajchert, 1991).

5.2.2 Número total de neuronas

Los resultados de nuestro estudio muestran que la densidad de neuronas en el Vp y en el Vip (alrededor de 25.000 y 22.000/mm³) es similar a la encontrada en los núcleos de los cordones posteriores (alrededor de 22.000 neuronas/mm³, Bermejo et al., 2003), estructuras consideradas como la primera estación de “relevo” y de procesamiento de la información mecanosensorial de todo el cuerpo a excepción de la de la cabeza. No obstante, ambas estructuras –el complejo trigeminal y los núcleos del cordón posterior– parecen tener funciones análogas en la recepción de la información sensitiva, y es lógico pensar que su organización debe ser similar. En el Vo se obtiene una densidad menor (13.300 neuronas/mm³) y en el Vc mayor (42.000 neuronas/mm³), diferencias que pueden ser fácilmente apreciables a la simple inspección visual.

5.2.3 Neuronas de proyección trigeminotalámica y trigeminocerebelosa

Respecto a la cuantificación de neuronas, existen algunos estudios que aportan algunos datos aunque únicamente respecto a subpoblaciones de las neuronas de proyección. El número medio de neuronas trigeminotalámicas en un grupo de ratas Wistar adultas hembras se estimó en 8.000 en el Vp, 600 en el Vo, 2.000 en el Vip y 250 en el Vc tras varias inyecciones amplias de HRP que afectaron casi por completo el tálamo de un lado (Kemplay y Webster, 1989). Estos datos contrastan enormemente con los presentados en esta Tesis: 18.400 en el Vp, 2.000 en el Vo, 10.400 en el Vip y 2.600 en el Vc, siendo

estos últimos muy superiores a los descritos con anterioridad. Debido a algunos de los graves sesgos en el procedimiento de cuantificación de los estudios anteriores, pensamos que los números presentados por Kemplay y Webster infraestiman en al menos tres veces el número de neuronas de proyección trigeminotalámica. Otras razones para explicar esta diferencia de resultados como inyecciones talámicas incompletas, un marcador retrógrado defectuoso o diferencias sustanciales en la delimitación de los núcleos trigeminales pueden ser descartadas como causas significativas, dadas las razonables descripciones y los diagramas presentados por los autores. El factor más importante radica en el proceso de cuantificación en sí mismo. Para cuantificar el número de neuronas, Kemplay y Webster dibujaron en un papel el número de neuronas marcadas que encontraron en una de cada cuatro secciones congeladas y cortadas a 60 μm de grosor, aplicando el factor de corrección de Abercrombie. Este procedimiento depende enormemente de la magnificación utilizada y de los criterios aplicados para marcar las células como positivas, hechos que los autores no comentan. Las neuronas débilmente marcadas pueden ser difíciles de reconocer y no tenerse en cuenta en la cuantificación cuando se visualizan con objetivos por debajo de 40X, que son generalmente los que se utilizan para dibujar las células en un papel. Además, se puede producir una infraestimación sustancial si sólo se seleccionan las neuronas aparentemente “completas” para ser dibujadas y se introducen otros factores de corrección para la cuantificación.

Los datos presentados por nuestro grupo se aproximan más a los de otro estudio anterior en el que se realizan inyecciones iontoforéticas más pequeñas en el Vp, y se encuentran alrededor de 20.000 neuronas marcadas en el Vp y 3.700 neuronas en el Vip (Mantle-St John y Tracey, 1987). Además, en otro estudio, se marcaron retrógradamente alrededor de 17.400 neuronas en el Vp mediante una amplia inyección con *diamidino yellow* en el tálamo en una única rata Sprague-Dawley (Bruce et al., 1987). En ninguno de estos estudios se explica el método de cuantificación con suficiente detalle, ni se introdujeron correcciones para la sobre- o la infraestimación.

El trabajo de Kemplay y Webster (1989) también cuantifica las neuronas de proyección talámica de los núcleos de los cordones posteriores grácil y cuneatus obteniendo unos resultados muy inferiores a los de Mantle-St. John y Tracey (1987) y a los publicados por nuestro grupo utilizando métodos estereológicos (Bermejo et al., 2003). Además, los datos aportados por Kemplay y Webster sugieren que las densidades neuronales en los núcleos de los cordones posteriores serían inferiores a las posteriormente descritas en otros estudios realizados en gatos para las mismas estructuras (Heino y Westman, 1991; Avendaño y Dykes, 1996). En comparación a los valores obtenidos en gato, nuestros

datos son consistentes con la proporcionalidad entre la densidad neuronal y la inversa de la raíz cúbica del volumen cerebral (Braitenberg, 2001).

Respecto a las neuronas de proyección trigeminocerebelosa, éstas se encuentran distribuidas a lo largo de todos los subnúcleos del trigémino, aunque de un modo heterogéneo. La mayor cantidad de estas neuronas se localiza en el Vip, donde alcanzan una densidad de $1.300/\text{mm}^3$ (3.600 neuronas) y en el Vp, con una densidad de $1.640/\text{mm}^3$ (2.300 neuronas). En este último núcleo se observa una clara diferencia entre la región posterodorsal que incluye la mayoría de las neuronas (1.940 neuronas) respecto a la Vpv, en la que únicamente se cuantifican 370 neuronas de media. Los subnúcleos Vc y Vo tienen una densidad de neuronas trigeminocerebelosas mucho menor ($210/\text{mm}^3$ y $560/\text{mm}^3$ respectivamente). Diferencias cualitativamente similares en las proyecciones al cerebelo entre los distintos subnúcleos del trigémino ya habían sido descritas con anterioridad aunque destaca la ausencia de datos cuantitativos (Steindler 1985; Falls et al., 1990; Yatim et al., 1996).

Las neuronas de proyección talámica parecen ser claramente diferentes de las de proyección cerebelosa, de hecho, son diferentes en cuanto a su localización, como se ha comentado en el Vp y suelen ser de diferentes tamaños. Concretamente, las neuronas de proyección trigeminocerebelosa son sensiblemente más grandes que las de proyección trigeminotalámica. Sin embargo, existe una proporción de neuronas que proyectan de forma simultánea al tálamo contralateral y al cerebelo (Matsushita et al., 1982; Steindler, 1985; Patrick y Robinson, 1987) para las que escasean los datos cuantitativos al respecto y que parecen estar presentes en un número muy escaso. Estos hallazgos son similares a los ya presentados en los núcleos de los cordones posteriores (Bermejo et al., 2003), en los que las neuronas de proyección talámica difieren de las que proyectan al cerebelo y son sensiblemente más pequeñas.

5.2.4 Expresión de GABA y glicina en el complejo sensitivo trigeminal

Al igual que otras regiones espinales y del tronco del encéfalo, el complejo trigeminal contiene una población de interneuronas que expresan GABA o glicina que ejercen efectos inhibitorios, principalmente a través de sinapsis axosomáticas y axoaxónicas (Irish et al., 1996; Bae et al., 2000; Bae et al., 2003). Aunque previamente a nuestro estudio de 2005 (Avendaño et al., 2005) no existían datos disponibles sobre el número absoluto o relativo sobre la expresión de neuronas gabaérgicas o glicinérgicas en el complejo trigeminal, las descripciones cualitativas disponibles por lo general concuerdan con

nuestros resultados. Las neuronas gabaérgicas por lo general son de pequeño tamaño y aparecen en todos los subnúcleos, aumentando su número desde el Vp hasta la región caudal del Vc, y predominando en las láminas superficiales en el Vip y el Vc (Ottersen y Storm-Mathisen, 1984; Haring et al., 1990; Ginestal y Matute, 1993; Polgár y Antal, 1995). Por su parte, la expresión de glicina también se produce de forma abundante en todos los núcleos y las neuronas glicinérgicas pueden mostrar un amplio rango de tamaños y tienden a distribuirse de forma irregular a lo largo de cada núcleo, siendo especialmente numerosas en el Vip (Rampon et al., 1996).

Se conoce que una fracción indeterminada de las interneuronas coexpresan GABA y glicina en el Vc (Dumba et al., 1998; Wang et al., 2000) y que incluso la liberación de ambos neurotransmisores se puede producir a partir de las mismas vesículas sinápticas (Burger et al., 1991; Chaudhry et al., 1998; Jonas et al., 1998; Chery y De Koninck, 1999; Dumoulin et al., 1999). Según los resultados de nuestro estudio, esa fracción representa hasta un 52% de todas las neuronas inmunorreactivas de ese núcleo. De hecho, la colocalización de ambos neurotransmisores no es exclusiva del Vc, sino que existe a lo largo de todo el complejo trigeminal. Está claramente demostrado que varios aminoácidos implicados en la neurotransmisión como el GABA, la glicina o el glutamato, pueden coexistir en la misma célula y pueden ser liberados conjuntamente de los mismos terminales (Somogyi, 2002). Este hecho complica considerablemente la interpretación del papel funcional de las neuronas sobre la única base de su inmunotinción por una u otra molécula. La coexistencia de GABA y glicina en los cuerpos neuronales y en los terminales axónicos se ha demostrado en otras estructuras espinales y troncoencefálicas, como las astas dorsal (Todd, 1996; Wang et al., 2000), y ventral de la médula (Shupliakov et al., 2003), los núcleos de los cordones posteriores (Popratiloff et al., 1996), los núcleos auditivos (Moore et al., 1996; Riquelme et al., 2001), el cerebelo (Ottersen et al., 1988) y los grupos celulares que rodean al núcleo motor del trigémino (Li et al., 2002).

5.2.5 Relaciones estructurales y funcionales entre las neuronas de proyección, internucleares y neuronas intrínsecas

La mayoría de las neuronas que componen el sistema trigeminal proyectan fuera del núcleo en el que reside el soma neuronal, con la excepción de las neuronas de la capa gelatinosa en el Vc. Aunque no se han encontrado aún datos cuantitativos similares para las astas dorsales de la médula espinal, sí se ha realizado en los núcleos de los cordones posteriores, donde la mayoría de las neuronas proyecta a estructuras distantes (Bermejo et

al., 2003). Mientras que las neuronas de proyección dominan de forma clara sólo en el Vp, las neuronas internucleares están presentes en todos los núcleos, siendo particularmente abundantes en el Vc y el Vip. Sus axones se distribuyen en direcciones ascendentes y descendentes (Falls, 1984; Jacquin et al., 1989a; Voisin et al., 2002) dando lugar a proyecciones colaterales intratrigeminales que juegan un papel importante en la ampliación y en la modelación de los campos receptivos circundantes de las neuronas trigeminotalámicas (Hallas and Jacquin, 1990; Timofeeva et al., 2004) y en la sensibilización de las neuronas nociceptivas de los núcleos rostrales (Chiang et al., 2002).

Los efectos fisiológicos directos de las proyecciones del Vc al Vo o al Vip son fundamentalmente excitatorios, aunque también podrían ser inhibitorios, probablemente a través de interneuronas inhibitorias locales (Hallas y Jacquin, 1990). El carácter predominantemente excitador de las interneuronas internucleares está apoyado por la imposibilidad de los estudios de doble marcado para identificar a estas interneuronas como gabaérgicas (Haring et al., 1990).

Las interneuronas intrínsecas probablemente representen interneuronas de inhibición local, aunque no se puede excluir la posibilidad de que algunas de ellas puedan ser excitatorias. Ya que el GABA y la glicina son neurotransmisores fundamentalmente inhibitorios en la médula espinal y en el tronco del encéfalo, se puede sugerir que las neuronas gabaérgicas y/o glicinérgicas encontradas en este estudio corresponden precisamente a la población de neuronas inhibitorias intrínsecas. De ser así, representarían una fracción considerable del número total de neuronas del complejo trigeminal. Ya que ambos marcadores colocalizan en alrededor del 75% de las neuronas inmunorreactivas encontradas en el Vp, y en el 50% de las halladas en el Vc (ver Resultados), entonces alrededor de un 45% de todas las neuronas del Vp y un 33% de las neuronas del Vc expresarían GABA y/o glicina. Existen sin embargo, algunas razones para pensar que la proporción real de las interneuronas inhibitorias sea en realidad algo menor que en los datos presentados: 1) Si ha existido algún encogimiento del tejido adicional durante la fijación que no ha sido tenido en cuenta en la cuantificación (ver Material y Métodos). Esto podría ser responsable de una sobreestimación de la densidad y del número total de neuronas marcadas. 2) Es posible que las neuronas glicinérgicas levemente marcadas únicamente indiquen la existencia de glicina como metabolito no relacionado con la neurotransmisión (Ottersen et al., 1988). 3) Es posible que un número pequeño de neuronas de proyección expresen GABA o glicina. Sin embargo, los datos presentados en esta Tesis niegan la existencia de esta posibilidad o la reducen a un mínimo, ya que de estas neuronas de proyección talámica que expresasen GABA y/o glicina no se encontró

ninguna en el muestreo realizado. La presencia de GABA en las neuronas de proyección talámica ya había sido negada con anterioridad en estudios de doble marcado (Haring et al., 1990; DiFiglia y Aronin, 1990), concordando estas publicaciones con los datos aquí presentados. Sin embargo, no está tan claro que neuronas de proyección a otras estructuras no puedan expresar a su vez GABA y/o glicina. De hecho, se han descrito algunas neuronas gabaérgicas y/o glicinérgicas en el Vp, el Vo y el Vip que a su vez proyectan a estructuras fuera del complejo sensitivo trigeminal, como los núcleos hipogloso, facial y motor del trigémino (Turman y Chandler, 1994; Li et al., 1996; Li et al., 1997). 4) Es posible que algunas de las neuronas gabaérgicas o glicinérgicas que se han cuantificado se traten en realidad de neuronas intersubnucleares, de las que se carece de datos cuantitativos. El mismo conflicto numérico se ha descrito en los núcleos de los cordones posteriores (Bermejo et al., 2003) y en estudios en gatos (Ellis y Rustioni, 1981; Rustioni et al., 1984; Heino y Westman, 1991).

5.3 MODIFICACIONES EN LA INHIBICIÓN GABAÉRGICA Y GLICINÉRGICA EN UN MODELO DE DOLOR NEUROPÁTICO

La reducción de la inhibición gabaérgica y glicinérgica podría dar lugar a un aumento de las respuestas sensitivas a las señales procedentes de la periferia y podría jugar un papel importante en la génesis de una hiperexcitabilidad patológica. Un ejemplo de esta hiperexcitabilidad en el sistema somatosensorial podría ser el dolor espontáneo y la alodinia táctil que sigue a la lesión de un nervio periférico.

5.3.1 Neurotransmisores GABA y glicina en los modelos de dolor neuropático

El complejo trigeminal sensitivo recibe tanto información táctil no algésica como nociceptiva a través de aferencias glutamatérgicas que se encarga de modular, lo que parece llevar a cabo mediante las interneuronas gabaérgicas y glicinérgicas (Zarbin et al., 1981; Avendaño et al., 2005; Bae et al., 2005). Los estudios electrofisiológicos indican que los antagonistas frente al receptor GABA_A aumentan el tamaño de los campos sensoriales periféricos de los núcleos del trigémino mientras que los agonistas los reducen (Takeda et al., 2000). Además, las interneuronas glicinérgicas han demostrado inhibir las respuestas somatosensoriales en el Vo (Ressot et al., 2001). Por ello, es razonable pensar que los mecanismos que contribuyen al desarrollo de dolor y alodinia tras la lesión

nerviosa podrían provocar cambios en la actividad gabaérgica y glicinérgica en el complejo trigeminal.

Aunque una gran proporción de las interneuronas del Vc son gabaérgicas o glicinérgicas que actúan inhibiendo la transmisión nociceptiva, persisten dudas sobre cómo estas neuronas se relacionan con la información aferente desde el nervio trigeminal y eferente hacia estructuras superiores. Aunque este procesamiento de la información nociceptiva en el Vc sigue siendo en su mayoría desconocido, en los últimos años se han desvelado parte de los mecanismos correspondientes al procesamiento de la información en el asta posterior de la médula, estructura equivalente al Vc. De hecho, en la sustancia gelatinosa del asta posterior de la médula se han descrito circuitos en los que se distinguen diversos tipos de interneuronas gabaérgicas inhibitorias que presentan diferentes conexiones con las neuronas aferentes y eferentes (Ribeiro da Silva y Cuello, 1995; Todd y Koerber, 2006; Zheng et al., 2010). Entre las fibras aferentes a esta lámina se encontrarían fibras A δ y varios tipos de fibras C, cada uno de los cuales tendría conexiones con unas u otras interneuronas, además de producirse interacciones dinámicas entre las diferentes regiones del circuito. Este circuito inhibitorio neuronal del asta posterior de la médula se representa en la figura 40 (Zheng et al., 2010) y existirían diferentes tipos de interneuronas inhibitorias.

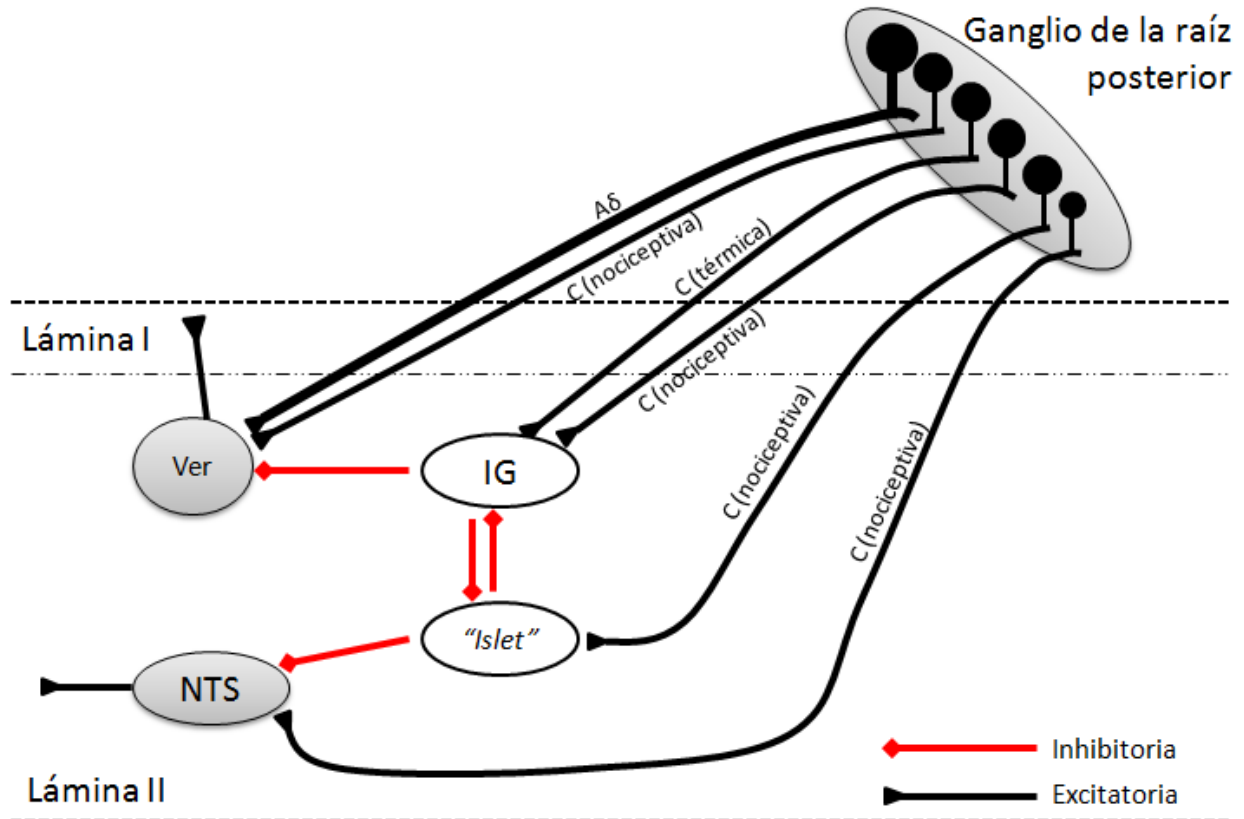


Figura 40. Modelo de terminaciones primarias selectivas en lámina 2 del asta posterior medular, y de un circuito neuronal en ésta. Modificado de Zheng et al (2010). Ver= neurona vertical; NTS= neurona de transmisión a niveles superiores; IG= interneurona gabaérgica. "Islet"= "células isleta".

Un grupo de estas neuronas, las células isleta o "islet cells" son interneuronas gabaérgicas que se definen morfológicamente por una orientación rostrocaudal de su árbol dendrítico (Todd y Spike, 1993) y que generalmente se caracterizan por seguir un patrón tónico de descargas. La inhibición de las conexiones inhibitorias (desinhibición) supondría un posible mecanismo del desarrollo del dolor neuropático tras la lesión de un nervio periférico. De hecho, se ha comprobado que la CCI es capaz de reducir las corrientes postsinápticas excitatorias espontáneas y en miniatura de estas neuronas, disminuyendo de esta forma, el tono gabaérgico en los estados de dolor neuropático (Laird y Bennett, 1992; Woolf y Mannion, 1999; Moore et al., 2002; Balasubramanyan et al., 2006) lo que podría contribuir a un aumento de la excitabilidad del complejo trigeminal o del asta posterior medular.

5.3.2 Receptores GABA

Uno de los mecanismos por los que teóricamente se podría perder la inhibición gabaérgica y contribuir a los comportamientos nociceptivos tras la lesión de los nervios periféricos es la pérdida de los receptores inhibitorios en las interneuronas del complejo trigeminal o en las sinapsis entre las neuronas aferentes primarias y las neuronas trigeminales. Se ha comprobado que la estimulación de estos receptores es capaz de disminuir la liberación de neurotransmisores desde las aferencias primarias (Kangrga et al., 1991; Ataka et al., 2000) y que hiperpolariza las neuronas del asta posterior de la médula disminuyendo la transmisión nociceptiva (Kangrga et al., 1991; Sokal y Chapman, 2003). Por lo tanto, sería posible que la pérdida o inactivación de estos receptores pudiese contribuir al desarrollo o mantenimiento de la alodinia, hiperalgesia o dolor espontáneo que se producen tras la lesión de un nervio periférico. También existe evidencia farmacológica que es consistente con que la pérdida de la inhibición gabaérgica contribuye al desarrollo de dolor neuropático, ya que los agonistas GABA_A y GABA_B son capaces de revertir la alodinia y la hiperalgesia en modelos de dolor neuropático (Hwang y Yaksh, 1997; Malan et al., 2002).

Sin embargo, los estudios de Moore et al (2002) no mostraron ninguna diferencia en el marcaje en el lado ipsilateral y contralateral del asta dorsal de la médula con un anticuerpo monoclonal frente a la subunidad $\beta_2/3$ del receptor GABA_A, tras la lesión de un nervio periférico. Sin embargo, este anticuerpo marca tanto los receptores sinápticos como extrasinápticos en las membranas plasmáticas (Álvarez et al., 1996), por lo que es difícil saber si existe algún tipo de alteración de las sinapsis gabaérgicas. Sin embargo, el reciente estudio de Polgár y Tood (2008) apoyan esta teoría debido a que no se produce una diferencia en el marcado de la subunidad β_3 del receptor GABA_A.

Tampoco se ha demostrado una variación entre los niveles de los receptores GABA_B en el asta dorsal de la médula tras la realización de una ligadura en el nervio espinal, medidos mediante métodos inmunohistoquímicos y con Western blot (Engle et al., 2006).

Por todo ello, parece que el descenso de los mecanismos inhibitorios no se explica por un descenso en la expresión de los receptores gabaérgicos.

5.3.3 Reducción de la inmunorreactividad gabaérgica y glicinérgica

Varios estudios han aportado evidencias a favor de que exista una pérdida de la inhibición gabaérgica en el asta posterior medular tras una lesión de los nervios periféricos. En este sentido, se ha comprobado que la CCI o la transección del nervio ciático reducen la

despolarización de las fibras aferentes a la médula espinal (Laird y Bennett, 1992) o que la transección nerviosa es capaz de inhibir las respuestas de las neuronas del asta posterior a los estímulos de las fibras A δ y C (Woolf y Wall, 1982). Moore et al (2002) observaron una reducción de la transmisión gabaérgica (pero no de la glicinérgica) de las corrientes postsinápticas inhibitorias aferentes en la lámina II del asta dorsal tras la realización de una CCI, aunque no después de una transección nerviosa completa.

Este hecho concuerda con los resultados obtenidos en nuestro estudio. Respecto a la inhibición gabaérgica, se observa una reducción muy significativa de las neuronas fuertemente inmunorreactivas para GABA en el Vc (-28,6%). Esta disminución de la inmunorreactividad gabaérgica tiene un gradiente rostrocaudal, de modo que la reducción en la región más caudal del núcleo es del 45,9% para las neuronas gabaérgicas fuertemente marcadas y de hasta un 30,4% del número de neuronas gabaérgicas totales. Este descenso únicamente se aprecia en el complejo trigeminal izquierdo (el correspondiente a la CCI-IoN), siendo la cuantificación normal en el lado “control” (derecho) con lo que parece claro que las diferencias entre los lados son debidas a la cirugía compresiva. Respecto a la inmunorreactividad para glicina, el descenso experimentado es menor pero también significativo para las neuronas fuertemente marcadas, evidenciándose una reducción del 28,6% respecto al grupo control. En este caso, sin embargo, la reducción es homogénea a lo largo de todo el Vc.

Este descenso de inmunorreactividad para GABA y para glicina podría contribuir al aumento de excitabilidad de las neuronas del Vp que se sigue después de una CCI-IoN y que puede justificar la existencia de alodinia, un incremento de las respuestas táctiles, lo cual ya ha sido sugerido por otros autores. Martin et al. (2010) demostraron una disminución de la inmunorreactividad para GAD65 en las láminas I y II del Vp tras la realización de una CCI-IoN que acompaña a una desinhibición de sus neuronas del Vc, capaz de explicar los signos objetivados en la exploración. El GAD65 es una de las dos isoformas de GAB implicadas en la síntesis de GABA y se ha propuesto que puede jugar un importante papel en la transmisión gabaérgica en condiciones fisiológicas (Kaufman et al., 1991; Soghomonian y Martin, 1988; Wu et al., 2007), frente al GAD67 que podría estar activo únicamente en situaciones concretas como el estrés o tras la administración de fármacos (Chattopadhyaya et al., 2007; Carta et al., 2008).

Al igual de lo que ocurre en la médula espinal (Todd y Koerber, 2006), las neuronas gabaérgicas del Vp establecen conexiones axodendríticas y axosomáticas con neuronas de las diferentes láminas, así como sinapsis axoaxónicas con las terminales aferentes primarias (DiFiglia y Aronin, 1990; Dumba et al., 1998; Bae et al., 2005). La abundancia

de los botones gabaérgicos y GAD+ en las láminas III y IV (Avendaño et al., 2005; Martin et al., 2010) sugieren que todas las neuronas de estas capas son dianas postsinápticas potenciales para las terminales gabaérgicas. En la médula espinal, algunas de estas neuronas también extienden sus dendritas hacia las láminas más superficiales (Brown et al., 1995; Polgár et al., 2007). De este modo, la actividad de la mayoría de las neuronas de proyección hacia niveles superiores puede estar controlada por la actividad de las neuronas gabaérgicas locales situadas en las distintas láminas.

Respecto a las interneuronas glicinérgicas, también se ha comprobado su papel en la nocicepción. La activación glicinérgica de la médula espinal parece ser un mecanismo fisiopatológico común en un gran número de síndromes dolorosos (Milligan y Watkins, 2009). Con su activación, tanto los astrocitos como la microglía responden liberando un elevado número de señales moleculares, que tienen funciones protectoras y/o patológicas (Benarroch, 2010). Otras de las funciones de la glicina es la modulación de los canales glutamatérgicos NMDA, los cuales también se han involucrado en la transmisión de dolor hacia niveles superiores. Todos estos mecanismos juegan un importante papel en la generación y el mantenimiento del dolor crónico (Kalia et al., 2008).

La pérdida de la inhibición mediada por GABA de las neuronas de proyección podría provocar un incremento de excitabilidad anormal de estas neuronas y una mayor transmisión de estímulos algésicos hacia niveles superiores. El descenso de inmunorreactividad gabaérgica objetivada tras la realización de una CCI-IoN podría reflejar un descenso en la producción de GABA por inhibición de sus enzimas de síntesis GAD65/GAD67, una pérdida de las interneuronas gabaérgicas por muerte celular o un aumento en la liberación del GABA con la consiguiente deplección de este neurotransmisor en el interior de las neuronas. Otra de las posibles explicaciones de la reducción de la inhibición gabaérgica tras la lesión de los nervios periféricos es que sea debido al descenso de las aferencias primarias a las neuronas gabaérgicas del asta posterior (Kohn et al., 2003).

Algunos modelos más agresivos de neuropatía periférica, como la lesión parcial del nervio ciático parecen inducir una pérdida específica de GAD65 en el asta posterior medular junto a una apoptosis neuronal (Moore et al., 2002). Sin embargo, no queda claro si la CCI del nervio ciático puede dar lugar a una pérdida de las neuronas del asta posterior medular (Woolf, 1997; Polgár et al., 2004), y en nuestro análisis del complejo trigeminal tras la CCI-IoN no pareció existir una clara pérdida de células. Estos datos concuerdan con los hallazgos descritos en el asta dorsal de la médula tras las lesiones de nervios periféricos. Se ha demostrado que en el lado intervenido no se produce una

elevación de los marcadores de apoptosis, como los anticuerpos anticaspasa-3 (Moore et al., 2002; Polgár et al., 2005). Además, el transportador vesicular del GABA se expresa por igual en ambos lados tras la realización de una lesión en el nervio periférico, lo cual sugiere que no se produce una pérdida de las neuronas gabaérgicas o de su arborización axonal (Polgár y Todd, 2008).

Como se indicó antes, Martín et al (2010) mostraron mediante estudios inmunohistoquímicos un descenso global en la inmunorreactividad para GAD65 en el Vp, sobre todo en las láminas I y II tras la realización de una CCI-IoN, sugiriendo la participación de una regulación a la baja del GAD en la inhibición de los circuitos inhibitorios en este modelo de dolor. Por otro lado, no existe ninguna evidencia para pensar que estos modelos de dolor podrían producir una mayor liberación de GABA de las interneuronas gabaérgicas. Por todo ello, el descenso de inmunorreactividad para GABA y glicina tras la CCI-IoN obtenido en esta Tesis probablemente se deba a una inhibición en la síntesis de estos neurotransmisores. Estos resultados concordarían con otros modelos animales que demuestran una disminución de la expresión gabaérgica en el asta posterior de la médula (Castro-Lopes et al., 1995; Eaton et al., 1998). El estudio de Polgár y Todd (2008), sin embargo no encuentra una disminución en la densidad de la inmunorreactividad para GABA en estos animales, con lo que sugieren que la disminución de la inmunorreactividad para este neurotransmisor se produce fundamentalmente en los cuerpos neuronales, sin que se produzcan cambios en el neuropilo.

Por todo ello hemos de concluir que, aun contando con datos muy sugerentes, no se puede determinar todavía con absoluta certeza el origen y los mecanismos de la reducción de la inhibición de las neuronas del Vp.

5.3.4 Modificaciones corticales en el modelo de CCI-IoN

En el análisis cortical de las neuronas gabaérgicas, se obtiene una ligera aunque significativa reducción de la inmunorreactividad para GABA en la corteza cerebral contralateral al lado intervenido, que se hace evidente en las neuronas fuertemente marcadas (-18,2%). Existen varias explicaciones por las que se podría producir esta modificación de actividad gabaérgica. Por un lado, es conocido que tras la privación sensorial, producida por la realización de una denervación permanente y de la destrucción del folículo (Welker et al., 1989a; Welker et al., 1989b) se produce una regulación a la baja de varias medidas de los sistemas corticales gabaérgicos. Además la vibrisectomía

parcial en los roedores adultos provoca una notable expansión de la representación cortical de las vibrisas adyacentes, tal y como se observa en los experimentos realizados con 2-deoxiglucosa (Kossut, 1998; Maier et al., 2003). El marcaje con 2-deoxiglucosa, nos muestra que se produce un aumento de la tasa metabólica, y este efecto además, se acompaña de un aumento importante de la extensión horizontal y de la densidad de los axones que proceden de los barriles intactos y en el número de neuronas corticales que proyectan a ellos (Kossut y Juliano, 1999).

Otra de las posibles explicaciones es que la corteza cerebral esté implicada en el procesamiento del dolor. De acuerdo con esta idea, Mao et al. (1993) determinaron, midiendo el consumo de glucosa, las regiones cerebrales que se encontraban anormalmente más activas tras la realización de una CCI. Describieron una gran cantidad de áreas cerebrales implicadas en el procesamiento nociceptivo supraespinal. Estas regiones incluyeron las áreas somatosensoriales corticales, la corteza cingulada, la amígdala, el núcleo ventral posterolateral del tálamo, el núcleo posterior del tálamo, el núcleo hipotalámico arcuato, las capas profundas del colículo superior, los núcleos reticulares del puente, el locus ceruleus, los núcleos parabraquiales, el núcleo reticular gigantocelular y el núcleo reticular paragigantocelular. A pesar de que la CCI se había realizado en un lado del animal, el incremento en el consumo de glucosa fue bilateral en la mayoría de las regiones estudiadas, aunque con un claro predominio por las zonas corticales contralaterales. Este aumento de actividad de la región somatosensorial contralateral concuerda con los resultados de nuestro estudio en el que la disminución de las neuronas gabaérgicas de esta localización podría estar detrás de ese aumento de actividad.

El exceso de respuesta de las neuronas de la CxSS a los estímulos nociceptivos ya ha sido descrito con anterioridad en estudios en humanos y en modelos animales (Lamour et al., 1983a; Willis, 1985). Estos estudios han sugerido que el aumento de actividad neuronal ocurre principalmente en las capas medias y profundas de la corteza, un hecho consistente con la gran concentración de neuronas nociceptivas que se han localizado en estas capas corticales en los estudios electrofisiológicos (Lamour et al., 1983a,b). Algunos estudios recientes han demostrado la liberación de GABA en condiciones de dolor en humanos (Kupers et al., 2009), lo que apoya la idea de que el GABA juega un papel importante en el procesamiento del dolor en humanos y está en consonancia con el papel analgésico de algunos fármacos gabaérgicos. Esta reorganización de la CxSS se ha comprobado en otros síndromes dolorosos secundarios a otras lesiones como el daño medular (Wrigley et al.,

2009), diversos síndromes de dolor central (Quiton et al., 2010), periférico (Guilbaud et al., 1992) y visceral (Lu et al., 2005).

Existen diversos estudios que apoyan un papel de las interneuronas gabaérgicas de la corteza cerebral en el control del dolor. Uno de los ejemplos más claros son las neuronas gabaérgicas situadas en la corteza orbitaria ventrolateral participan que, a través de conexiones descendientes con la sustancia gris periacueductal, participan en la modulación de la información nociceptiva ascendente (Huo et al., 2008; Qu et al., 2006). La implicación de estas estructuras estaría en consonancia con los recientes estudios publicados que indican que la hiperalgesia y la alodinia en modelos animales de dolor persistente está estrechamente relacionada con la activación a largo plazo de circuitos descendientes moduladores. Entre ellas destacan las situadas en el tronco del encéfalo como la región rostroventral del bulbo, la sustancia gris periacueductal, el locus ceruleus y los núcleos del rafe (Takasu et al., 2008). Sin embargo, en los últimos años se han descubierto diversas estructuras corticales que se modifican tras la realización de una lesión en nervios periféricos (Hoot et al., 2010).

5.4 MODIFICACIONES EN LA RESPUESTA DE LAS NEURONAS GABAÉRGICAS Y GLICINÉRGICAS A LA ADMINISTRACIÓN DE GBP

Aunque la GBP es un fármaco clásico con gran experiencia de uso tanto en humanos como en modelos animales, su mecanismo de acción aún no es del todo conocido. Clásicamente se conoce que la GBP se une a la subunidad $\alpha 2\delta$ -1 de los canales de calcio dependientes de voltaje (Gee et al., 1996), lo que da lugar a una hipoexcitabilidad de la neurona presináptica y de esta forma puede modular la transmisión sináptica (Patel et al., 2000; Shimoyama et al., 2000; Bayer et al., 2004) y justificar los efectos antialodínicos (Luo et al., 2001; 2002) observados con el fármaco. Sin embargo, existe una evidencia creciente de la existencia de mecanismos adicionales que parecen contribuir a los efectos de la GBP (Urban et al., 2005; Lynch et al., 2006). Estos mecanismos de acción potenciales incluyen tanto el sistema glutamatérgico, el gabaérgico, diversos canales iónicos y el sistema transportador de aminoácidos (Cheng y Chiou, 2006).

5.4.1 Mecanismos de acción antinociceptivos de la GBP además del sistema gabaérgico

Como se indicó más arriba, el principal mecanismo de acción de la GBP parece ser su unión a la subunidad $\alpha 2\delta$ de los canales de calcio, con lo que podría afectar a las

corrientes de calcio y modular la liberación de neurotransmisores y la hiperexcitabilidad neuronal (Stefani et al., 1998; Fink et al., 2002; Maneuf et al., 2003). Concretamente, la subunidad $\alpha 2\delta$ -1 de los canales de calcio parece estar aumentada en los modelos animales de dolor que son sensibles a la acción de la GBP (Luo et al., 2001; Luo et al., 2002; Li et al., 2004) mientras que no lo está en aquellos modelos que son insensibles a la acción de este fármaco, por lo que se ha sugerido que esta subunidad puede ser la diana terapéutica a través de la cual la GBP ejerza su efecto antinociceptivo. La consecuencia de la inhibición de los canales de calcio por GBP, daría lugar a una disminución de la excitabilidad neuronal y de la transmisión sináptica. De hecho, se ha comprobado que este fármaco es capaz de reducir la liberación de aminoácidos excitatorios en la médula espinal en varios modelos animales de dolor neuropático (Feng et al., 2003; Coderre et al., 2005; Lin et al., 2005).

Respecto al sistema glutamatérgico, se ha descrito que la GBP es capaz de inhibir tanto la transmisión sináptica excitadora *in vitro* (Shimoyama et al., 2000) como la respuesta neuronal a estímulos eléctricos y mecánicos *in vivo* mediados por AMPA (Chizh et al., 2000), pero no por NMDA, con lo que se ha sugerido que la GBP pudiese actuar como un antagonista del receptor AMPA. También se ha encontrado que la D-serina, un agonista en el punto de unión de la glicina del receptor NMDA, es capaz de inhibir el efecto antinociceptivo de la GBP, lo que se ha sugerido a través de una potencial unión a este receptor (Carlton y Zhou, 1998; Jun y Yaksh, 1998). Por otro lado, se ha sugerido que la GBP potencia las corrientes glutamatérgicas a través de los receptores NMDA de forma selectiva en las neuronas gabaérgicas del asta posterior medular y del Vc en los modelos animales de dolor (Gu y Huang, 1998). Esta teoría apuntaría a la posibilidad de que la GBP podría cumplir su efecto antinociceptivo a través de un aumento de liberación del GABA. Sin embargo, este efecto no ha sido confirmado y existen datos en contra, como el hecho de que los agonistas de los receptores NMDA no revierten el efecto antinociceptivo de la GBP en los modelos animales (Hwang y Yaksh, 1997; Yoon et al., 2003; Cheng et al., 2004; Cheng et al., 2006). Además existen estudios que sugieren que la GBP disminuye la concentración de glutamato en el cerebro aunque estos resultados no han sido confirmados (Errante y Petroff, 2003; Xu et al., 2004).

Por último, la GBP puede ser reconocida por el sistema transportador de aminoácidos que es responsable de la entrada de los aminoácidos en las células y de su absorción intestinal (Su et al., 1995; Gidal et al., 2000) debido a que en su estructura posee un terminal amina y un terminal ácido simulando la estructura de un aminoácido α . El hecho de que el bloqueo de este transporte no inhiba las acciones analgésicas de la GBP sugiere que no es

necesario que este fármaco sea transportado al interior celular para que lleve a cabo su papel frente al dolor neuropático (Cheng et al., 2000; Yoon et al., 2003).

5.4.2. Papel de la GBP en los sistemas gabaérgico y glicinérgico

A pesar de que la GBP fue diseñada como un análogo del GABA, muestra poca afinidad por los receptores GABA_A o GABA_B y no parece que estos dos receptores participen en los efectos antinociceptivos de la GBP.

Otro de los mecanismos de acción potenciales de la GBP es que aumente la liberación del GABA, lo cual ha sido descrito en diversos estudios (Kocsis et al., 1994; Honmou et al., 1995) aunque también existen autores que niegan esta posibilidad (Brawek et al., 2009).

El hecho de que la GBP aumente la liberación de GABA disminuiría la inmunorreactividad de este neurotransmisor en las interneuronas, lo cual concordaría con los resultados obtenidos en nuestro estudio. Según nuestros datos, se observaría una reducción muy significativa de las interneuronas fuertemente reactivas para GABA en los distintos subnúcleos del complejo trigeminal, así como en la corteza cerebral. Este descenso de inmunorreactividad para neuronas fuertemente marcadas es significativo para todas las regiones estudiadas y sería más marcado en el Vp donde el descenso sería del 69,9%. Respecto a las distintas áreas del Vc, también se produciría una disminución en todas las estudiadas de forma significativa, siendo el descenso mayor en la región caudal, seguido de la intermedia y la rostral, indicando que la disminución de inmunorreactividad para GABA es global tras la administración de GBP, a diferencia de lo que ocurriría al realizar una CCI-IoN, donde el descenso de inmunorreactividad gabaérgica se producía preferentemente en la región caudal del Vc. El hecho de que en los animales tratados con GBP, el descenso afecte sobre todo a las neuronas gabaérgicas fuertemente marcadas lleva a pensar que muchas de ellas pasarían a aparecer como débilmente marcadas, y algunas de éstas perderían la inmunorreactividad, lo que sería compatible con que el tratamiento afectaría al total de las neuronas gabaérgicas.

La disminución de la expresión de GABA se podría explicar porque la GBP produjese una pérdida de neuronas gabaérgicas, una disminución de su síntesis o un aumento de la exocitosis de este neurotransmisor. Errante y Petroff (2003) determinaron mediante espectrometría que la GBP no modifica la concentración de GABA en el neocórtex humano, lo cual estaría en contra de las dos primeras opciones y a favor de que este fármaco es capaz de aumentar la liberación de GABA. Además, el estudio del tejido no aporta datos a favor de una pérdida de neuronas gabaérgicas y sí a favor de que exista una

alta inmunorreactividad para GABA en el neuropilo en aquellos animales tratados con GBP (figura 37). Kuznieky et al (2002) realizaron un estudio en voluntarios humanos con altas dosis de GBP y midieron la concentración de GABA en la corteza occipital mediante resonancia magnética. Estos autores demostraron un ligero aumento de GABA tras la administración del fármaco, lo cual nuevamente está en desacuerdo con que la GBP produzca una reducción de la síntesis de GABA. Esta elevación tras dosis altas de GBP mediante resonancia magnética también ha sido corroborada por otros autores (Petroff et al., 2000) y podría ser debido a la capacidad de la GBP para incrementar la actividad de la descarboxilasa del ácido glutámico (Taylor et al., 1992) o promover una liberación no vesicular del GABA (Honmou et al., 1995).

Por todo ello, sugerimos como primera posibilidad que la administración de GBP, además de otros mecanismos de acción, aumenta la exocitosis de GABA con lo que es capaz de inhibir la neurona postsináptica y, de esta forma, ejercer su papel como tratamiento en patologías que llevan asociado un componente de hiperexcitabilidad neuronal, como el dolor neuropático o la epilepsia, primera indicación para la que fue diseñada.

Este descenso de inmunorreactividad para el GABA se produce tanto en los animales controles como en aquellos que han sido sometidos a una CCI-IoN. En estos últimos se suman los efectos de la cirugía y de la administración de la GBP, con lo que la modificación que producen los primeros, no se puede detectar ya que la posterior administración de GBP da lugar a una disminución generalizada de la inmunorreactividad para GABA.

Un hecho similar ocurriría con la glicina, neurotransmisor para el cual también se advierte un claro descenso de su inmunorreactividad tras la administración de GBP en las interneuronas de los núcleos trigeminales estudiados. La experiencia que se posee sobre la modificación de la transmisión glicinérgica con GBP es muy escasa y únicamente el estudio de Karkar et al (2004) hace referencia a ello. Según sus resultados, la GBP a dosis supraterapéuticas era capaz de producir una ligera inhibición de la transmisión glicinérgica, lo cual concordaría con los resultados obtenidos en esta Tesis Doctoral.

6. CONCLUSIONES

- 1- Esta Tesis Doctoral proporciona la primera descripción cuantitativa del número total de neuronas, neuronas de proyección y neuronas gabaérgicas y glicinérgicas del complejo trigeminal sensitivo de la rata. Los números obtenidos exponen, en términos cuantitativos, preguntas complejas sobre las proporciones relativas entre las interneuronas inhibitorias y otras subpoblaciones neuronales. Las diferencias existentes entre los resultados expuestos en esta Tesis Doctoral y los anteriormente publicados, suponen un fuerte llamamiento a la necesidad de utilizar métodos cuantitativos controlados y no sesgados como la estereología en la medición de estructuras cerebrales y en la cuantificación de los diferentes tipos de neuronas.
- 2- Existe una proporción constante de neuronas de proyección en el complejo trigeminal que envían sus proyecciones al tálamo o al cerebelo. Existen claras diferencias entre los diferentes subnúcleos trigeminales en cuanto a su proyección, siendo mayor para el Vp y menor para el Vc. Los porcentajes de proyección al tálamo son 1,6% para el Vc, 16,7% para el Vip, 9,5% para el Vo y 52,6% para el Vp. Respecto a las proyecciones trigeminocerebelosas, los porcentajes son 0,5% para el Vc, 6,4% para el Vip, 4,3% para el Vo y 6,3% para el Vp. Este número de proyecciones es significativamente mayor que los publicados en estudios anteriores, lo que vuelve a recalcar la importancia del empleo de estudios cuantitativos controlados y no sesgados.
- 3- Las interneuronas gabaérgicas y glicinérgicas representan una proporción importante del total de neuronas del complejo trigeminal, existiendo entre ellas una alta colocalización de los aminoácidos GABA y glicina, especialmente evidente en la región rostral del Vc. Además, estos neurotransmisores no se han demostrado en las neuronas de proyección, lo que sugeriría que ejercen papeles inhibitorios de ámbito local.
- 4- Existe una amplia evidencia a favor del desarrollo de mecanismos de desinhibición central tras la realización de una CCI-IoN que explicarían el desarrollo de la hiperalgesia y la alodinia que experimentan estos animales tras la cirugía. Los neurotransmisores GABA y glicina juegan un papel importante en los mecanismos de desinhibición central.
- 5- Nuestros datos muestran que estos mecanismos de desinhibición central tras la realización de una CCI-IoN implicarían una disminución de la inmunorreactividad para GABA y para glicina en las interneuronas del complejo trigeminal ipsilateral

- a la cirugía, con preferencia de la región caudal para el GABA y de una forma más homogénea para la glicina en el Vc. Además, se produciría un descenso de inmunorreactividad para GABA en las interneuronas gabaérgicas de la CxSS contralateral a la CCI-IoN, claramente evidente para las neuronas fuertemente marcadas. Aunque esto podría apoyar la participación de neuronas gabaérgicas de niveles superiores en el procesamiento del dolor neuropático no podemos descartar con nuestros datos que esta disminución sea debida a una deprivación sensorial parcial.
- 6- La GBP produce por sí misma en animales controles, una disminución de la inmunorreactividad gabaérgica y glicinérgica de las interneuronas en el complejo trigeminal, pero no en la CxSS. Nuestros resultados, y sin descartar otros efectos neuroquímicos, apoyan que la GBP es capaz de aumentar la liberación de GABA de las interneuronas. Por otro lado, el descenso de inmunorreactividad gabaérgica en estas interneuronas tras la administración de GBP se produce tanto en los animales controles como en aquellos que han sido sometidos a una CCI-IoN por lo que, al sumarse los efectos de la cirugía y de la administración de la GBP, resulta difícil extraer conclusiones sobre los mecanismos de acción en el modelo de dolor neuropático que se ha presentado.
 - 7- El estudio cuantitativo mediante métodos no sesgados de las interneuronas inhibitorias gabaérgicas y glicinérgicas, además del estudio morfológico minucioso del complejo sensitivo trigeminal, nos han permitido profundizar en la valoración de los mecanismos inhibitorios implicados en un modelo de dolor neuropático, así como su modificación tras la administración de gabapentina, uno de los fármacos más utilizados en los síndromes clínicos que cursan con este tipo de dolor.

7. BIBLIOGRAFÍA

1. Abercrombie M. 1946. Estimation of nuclear population from microtome sections. *Anat Rec* 94: 239-247.
2. Ahlgren SC, Levine JD. 1993. Mechanical hyperalgesia in streptozotocin-diabetic rats. *Neuroscience* 52: 1049-1055.
3. Álvarez FJ, Taylor-Blake B, Fyffe RE, De Blas AL, Light AR. 1996. Distribution of immunoreactivity for the beta 2 and beta 3 subunits of the GABA_A receptor in the mammalian spinal cord. *J Comp Neurol* 365: 392-412.
4. Arends JJ, Jacquin MF. 1993. Lucifer yellow staining in fixed brain slices: optimal methods and compatibility with somatotopic markers in neonatal brain. *J Neurosci Methods* 50: 321-339.
5. Ashkenazi A, Young WB. 2004. Dynamic mechanical (brush) allodynia in cluster headache. *Headache* 44: 1010-1012.
6. Ataka T, Kumamoto E, Shimoji K, Yoshimura M. 2002. Baclofen inhibits more effectively C-afferent than Delta-afferent glutamatergic transmission in substantia gelatinosa neurons of adult rat spinal cord slices. *Pain* 86: 273-282.
7. Avendaño C. 1996. Aplicación de la estereología a la inmunocitoquímica. In: Peinado MA, Pedrosa JA, Rodrigo J, editors. *Avances en inmunocitoquímica y técnicas relacionadas*. Jaén: University Jaén, p 229-238.
8. Avendaño C. 2005. Stereology of neural connections. An overview. In: Zaborszky L, Wouterlood FG, Lanciego JL, editors. *Neuroanatomical tract tracing: molecules, neurons, & systems*. Berlin: Springer Science & Business Media.
9. Avendaño C, Dykes RW. 1996. Quantitative analysis of anatomical changes in the cuneate nucleus following forelimb denervation: a stereological morphometric study in adult cats. *J Comp Neurol* 370: 491-500.
10. Avendaño C, Machín R, Bermejo PE, Lagares A. 2005. Neuron numbers in the sensory trigeminal nuclei of the rat: A GABA- and glycine-immunocytochemical and stereological analysis. *J Comp Neurol* 493: 538-53.
11. Back SK, Won SY, Hong SK, Na HS. 2004. Gabapentin relieves mechanical, warm and cold allodynia in a rat model of peripheral neuropathy. *Neurosci Lett* 368: 341-4.
12. Backonja M, Glanzman RL. 2003. Gabapentin dosing for neuropathic pain: evidence from randomized, placebo-controlled clinical trials. *Clin Ther* 25: 81-104.
13. Backonja MM, Stacey B. Neuropathic pain symptoms relative to overall pain rating. 2004. *J Pain* 5: 491-7.
14. Bae YC, Ahn HJ, Park KP, Kim HN, Paik SK, Bae JY et al. 2005. The synaptic microcircuitry associated with primary afferent terminals in the interpolaris and caudalis of trigeminal sensory nuclear complex. *Brain Res*; 1060: 118-125.
15. Bae YC, Ihn HJ, Park MJ, Ottersen OP, Moritani M, Yoshida A, Shigenaga Y. 2000. Identification of signal substances in synapses made between primary afferents and their associated axon terminals in the rat trigeminal sensory nuclei. *J Comp Neurol* 418: 299-309.
16. Bae YC, Kim JP, Choi BJ, Park KP, Choi MK, Moritani M, Yoshida A, Shigenaga Y. 2003. Synaptic organization of tooth pulp afferent terminals in the rat trigeminal sensory nuclei. *J Comp Neurol* 463: 13-24.
17. Balasubramanian S, Stemkowski PL, Stebbing MJ, Smith PA. 2006. Sciatic chronic constriction injury produces cell-type-specific changes in the electrophysiological properties of rat substantia gelatinosa neurons. *J Neurophysiol* 96: 579-590.
18. Baron R, Binder A, Wasner G. 2010. Neuropathic pain: diagnosis, pathophysiological mechanisms, and treatment. *Lancet Neurol* 9: 807-819.
19. Bates CA, Killackey HP. 1985. The organization of the neonatal rat's brainstem trigeminal complex and its role in the formation of central trigeminal patterns. *J Comp Neurol* 240: 265-287.

20. Bayer K, Ahmadi S, Zeilhofer HU. 2004. Gabapentin may inhibit synaptic transmission in the mouse spinal cord dorsal horn through a preferential block of P/Q-type Ca²⁺ channels. *Neuropharmacology* 46: 743–749.
21. Benarroch EE. 2010. Central neuron-glia interactions and neuropathic pain: overview of recent concepts and clinical implications. *Neurology* 75: 273-278.
22. Bennett GJ, Xie YK. 1988. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 33: 87–107.
23. Bereiter DA, Bereiter DF, Tonnessen BH, Maclean DB. 1998. Selective blockade of substance P or neurokinin A receptors reduces the expression of c-fos in trigeminal subnucleus caudalis after corneal stimulation in the rat. *Neuroscience* 83: 525-534.
24. Bermejo PE, Anciones B. 2009. Neuromodulators and therapeutic targets in neuropathic pain: from molecules to man. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 8: 175-183.
25. Bermejo PE, Velasco R. 2007. Nuevos fármacos antiepilépticos y dolor neuropático. De la medicina molecular a la práctica clínica. *Med Clin (Barc)* 129: 542-550.
26. Bermejo PE, Jiménez CE, Torres CV, Avendaño C. 2003. Quantitative stereological evaluation of the gracile and cuneate nuclei and their projection neurons in the rat. *J Comp Neurol* 463: 419-33.
27. Bermejo PE, Oreja-Guevara C, Díez-Tejedor E. 2010. Dolor en la esclerosis múltiple: prevalencia, mecanismos, tipos y tratamiento. *Rev Neurol* 50: 101-108.
28. Blasco B, Avendaño C, Cavada C. 1999. A stereological analysis of the lateral geniculate nucleus in adult *Macaca nemestrina* monkeys. *Vis Neurosci* 16: 933–941.
29. Braitenberg V. 2001. Brain size and number of neurons: an exercise in synthetic neuroanatomy. *J Comput Neuroanat* 10: 71–77.
30. Brawek B, Löffler M, Weyerbrock A, Feuerstein TJ. 2009. Effects of gabapentin and pregabalin on K⁺-evoked 3H-GABA and 3H-glutamate release from human neocortical synaptosomes. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 379: 361-369.
31. Brown JL, Liu H, Maggio JE, Vigna SR, Mantyh PW, Basbaum AI. 1995. Morphological characterization of substance P receptor-immunoreactive neurons in the rat spinal cord and trigeminal nucleus caudalis. *J Comp Neurol* 356: 327–344.
32. Bruce LL, McHaffie JG, Stein BE. 1987. The organization of trigeminothalamic and trigeminothalamic neurons in rodents: a double-labeling study with fluorescent dyes. *J Comp Neurol* 262: 315-330.
33. Buisseret-Delmas C, Pinganaud G, Compoin C, Buisseret P. 1997. Projection from trigeminal nuclei to neurons of the mesencephalic trigeminal nucleus in rat. *Neurosci Lett* 229: 189–192.
34. Burger PM, Hell J, Mehl E, Krasel C, Lottspeich F, Jahn R. 1991. GABA and glycine in synaptic vesicles: storage and transport characteristics. *Neuron* 7: 287-93.
35. Burstein R, Jakubowski M, Garcia-Nicas E, Kainz V, Bajwa Z, Hargreaves R et al. 2010. Thalamic sensitization transforms localized pain into widespread allodynia. *Ann Neurol* 68: 81-91.
36. Burton H, Craig AD, Poulos DA, Molt JT. 1979. Efferent projections from temperature sensitive recording loci within the marginal zone of the nucleus caudalis of the spinal trigeminal complex in the cat. *J Comp Neurol* 183: 753-757.
37. Buzzi MG, Tassorelli C. 2010. Experimental models of migraine. *Handb Clin Neurol* 97:109-123.
38. Carlton SM, Zhou S. 1998. Attenuation of formalin-induced nociceptive behaviours following local peripheral injection of gabapentina. *Pain* 76: 65-67.
39. Carta AR, Moreno CC, Cadoni C, Tronci E, Di Chiara G. 2008. Long-term increase in GAD67 mRNA expression in the central amygdala of rats sensitized by drugs and stress. *Eur J Neurosci*. 27: 1220-1230.

40. Carvell GE, Simons DJ. 1990. Biometric analyses of vibrissal tactile discrimination in the rat. *J Neurosci* 10: 2638-2648.
41. Castro-Lopes JM, Malcangio M, Pan BH, Bowery NG. 1995. Complex changes of GABA_A and GABA_B receptor binding in the spinal cord dorsal horn following peripheral inflammation or neurectomy. *Brain Res* 679: 289-297.
42. Castro-Lopes JM. 2007. Fisiopatología del dolor neuropático. In: Catafau S, editors. *Tratado de dolor neuropático*. Madrid: Editorial Médica Panamericana.
43. Chattopadhyaya B, Di Cristo G, Wu CZ, Knott G, Kuhlman S, Fu Y et al. 2007. GAD67-mediated GABA synthesis and signaling regulate inhibitory synaptic innervation in the visual cortex. *Neuron* 54: 889-903.
44. Chaudhry FA, Reimer RJ, Bellocchio EE, Danbolt NC, Osen KK, Edwards RH et al. 1998. The vesicular GABA transporter, VGAT, localizes to synaptic vesicles in sets of glycinergic as well as GABAergic neurons. *J Neurosci* 18: 9733-9750.
45. Chen Y, Balasubramanyan S, Lai AY, Todd KG, Smith PA. 2009. Effects of sciatic nerve axotomy on excitatory synaptic transmission in rat substantia gelatinosa. *J Neurophysiol* 102: 3203-3215.
46. Cheng JK, Chen CC, Yang JR, Chiou LC. 2006. The antiallodynic action target of intrathecal gabapentina: Ca²⁺ channels, K_{ATP} channels of N-methyl-d-aspartic acid receptors? *Anesth Analg* 102: 182-187.
47. Cheng JK, Chiou LC. 2006. Mechanisms of the antinociceptive action of gabapentin. *J Pharmacol Sci* 100: 471-486.
48. Cheng JK, Lee SZ, Yang JR, Wang CH, Liao YY, Chen CC et al. 2004. Does gabapentin act as an agonist at native GABA_B receptors? *J Biomed Sci* 11: 346-355.
49. Cheng JK, Pan HL, Eisenach JC. 2000. Antiallodynic effect of intrathecal gabapentina and its interaction with clonidine in a rat model of postoperative pain. *Anesthesiology* 92: 1126-1131.
50. Chéry N, de Koninck Y. 1999. Junctional versus extrajunctional glycine and GABA(A) receptor-mediated IPSCs in identified lamina I neurons of the adult rat spinal cord. *J Neurosci* 19: 7342-7355.
51. Chesler EJ, Wilson SG, Lariviere WR, Rodriguez-Zas SL, Mogil JS. 2002. Influences of laboratory environment on behavior. *Nat Neurosci* 5: 1101-1102.
52. Chiaia NL, Rhoades RW, Bennett-Clarke CA, Fish SE, Killackey HP. 1991. Thalamic processing of vibrissal information in the rat. I. Afferent input to the medial ventral posterior and posterior nuclei. *J Comp Neurol* 314: 201-216.
53. Chiang CY, Hu B, Hu JW, Dostrovsky JO, Sessle BJ. 2002. Central sensitization of nociceptive neurons in trigeminal subnucleus oralis depends on integrity of subnucleus caudalis. *J Neurophysiol* 88: 256-264.
54. Chizh BA, Scheede M, Schlutz H. 2000. Antinociception and (R,S)-alpha-amino-3-hydroxy-5-methyl-4-isoxazole propionic acid antagonism by gabapentina in the rat spinal cord in vivo. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol* 362: 197-200.
55. Christensen D, Gautron M, Guilbaud G, Kayser V. 1999. Combined systemic administration of the glycine/NMDA receptor antagonist, (1)-HA966 and morphine attenuates pain-related behaviour in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Pain* 83: 433-440.
56. Coderre TJ, Kumar N, Lefebvre CD, Yu JS. 2005. Evidence that gabapentin reduces neuropathic pain by inhibiting the spinal release of glutamate. *J Neurochem* 94: 1131-1139.
57. Costigan M, Scholz J, Woolf CJ. 2009. Neuropathic pain: a maladaptative response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci* 32: 1-32.
58. Crissman RS, Sodeman T, Denton AM, Warden RJ, Siciliano DA, Rhoades RW. 1996. Organization of primary afferent axons in the trigeminal sensory root and tract of the rat. *J Comp Neurol* 264: 169-183.

59. Cronin JN, Bradbury EJ, Lidieth M. 2004. Laminar distribution of GABAA- and glycine-receptor mediated tonic inhibition in the dorsal horn of the rat lumbar spinal cord: effects of picrotoxin and strychnine on expression of Fos-like immunoreactivity. *Pain* 112: 156–163.
60. Cryan JF, Holmes A. 2005. The ascend of mouse: advances in modeling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* 4: 775-790.
61. Daemen MA, Hoogland G, Cijntje JM, Spincemaille GH. 2008. Upregulation of the GABA-transporter GAT-1 in the spinal cord contributes to pain behaviour in experimental neuropathy. *Neurosci Lett* 444: 112-115.
62. Dai Y, Iwata K, Fukuoka T, Kondo E, Tokunaga A, Yamanaka H et al. 2002. Phosphorylation of extracellular signal-regulated kinase in primary afferent neurons by noxious stimuli and its involvement in peripheral sensitization. *J Neurosci* 22: 7737–7745.
63. Day AS, Lue JH, Sun WZ, Shieh JY, Wen CY. 2001. A beta-fiber intensity stimulation of chronically constricted median nerve induces c-fos expression in thalamic projection neurons of the cuneate nucleus in rats with behavioral signs of neuropathic pain. *Brain Res* 895: 194-203.
64. De la O-Arciniega M, Díaz-Reval MI, Cortés-Arroyo AR, Domínguez-Ramírez AM, López-Muñoz FJ. 2009. Anti-nociceptive synergism of morphine and gabapentin in neuropathic pain induced by chronic constriction injury. *Pharmacol Biochem Behav* 92: 457-464.
65. Deacon RM. 2006. Housing, husbandry and handling of rodents for behavioral experiments. *Nat Protoc.* 1: 936-946.
66. Devoize L, Doméjean S, Melin C, Raboisson P, Artola A, Dallel R. 2010. Organization of projections from the spinal trigeminal subnucleus oralis to the spinal cord in the rat: a neuroanatomical substrate for reciprocal orofacial-cervical interactions. *Brain Res* 1343: 75-82.
67. Del Río R, De Felipe J. 1996. Colocalization of calbindin D-28k, calretinin, and GABA immunoreactivities in neurons of the human temporal cortex. *J Comp Neurol* 369: 472–482.
68. Di Figlia M, Aronin N. 1990. Synaptic interactions between GABAergic neurons and trigeminothalamic cells in the rat trigeminal nucleus caudalis. *Synapse* 6: 358-363.
69. Diamond ME. 1995. Somatosensory thalamus of the rat. In: Jones EG, Diamond IT, editors. *The barrel cortex of rodents*. New York: Plenum., p 189-219.
70. Diamond ME, von HM, Knutsen PM, Kleinfeld D, Ahissar E. 2008. “Where” and “what” in the whisker sensorimotor system. *Nat Rev Neurosci* 9: 601-612.
71. Dorph-Petersen KA, Nyengaard JR, Gundersen HJG. 2001. Tissue shrinkage and unbiased stereological estimation of particle number and size. *J Microsc* 204:232–246.
72. Doth AH, Hansson PT, Jensen MP, Taylor RS. 2010. The burden of neuropathic pain: a systematic review and meta-analysis of health utilities. *Pain.* 149: 338-344.
73. Dubner R, Bennett GJ. 1983. Spinal and trigeminal mechanisms of nociception. *Annu Rev Neurosci* 6: 381-418.
74. Dumba JS, Irish PS, Anderson NL, Westrum LE. 1998. Electron microscopic analysis of gamma-aminobutyric acid and glycine colocalization in rat trigeminal subnucleus caudalis. *Brain Res* 806:16–25.
75. Dumoulin A, Rostaing P, Bedet C, Lévi S, Isambert MF, Henry JP et al. 1999. Presence of the vesicular inhibitory amino acid transporter in GABAergic and glycinergic synaptic terminal boutons. *J Cell Sci* 112: 811-823.
76. Eaton MJ, Plunkett JA, Karmally S, Martínez MA, Montañez K. 1998. Changes in GAD- and GABA-immunoreactivity in the spinal dorsal horn after peripheral nerve injury and promotion of recovery by lumbar transplant of immortalized serotonergic precursors. *J Chem Neuroanat* 16: 57-72.
77. Ellis LC Jr, Rustioni A. 1981. A correlative HRP, Golgi, and EM study of the intrinsic organization of the feline dorsal column nuclei. *J Comp Neurol* 197: 341–367.
78. Emmez H, Börcek AÖ, Kaymaz M, Kaymaz F, Durdağ E, Civi S et al. 2010. Neuroprotective effects of gabapentin in experimental spinal cord injury. *World Neurosurg* 73: 729-734.

79. Engle MP, Gassman M, Sykes KT, Bettler B, Hammond DL. 2006. Spinal nerve ligation does not alter the expression or function of GABA_B receptors in spinal cord and dorsal root ganglia of the rat. *Neuroscience* 138: 1277-1287.
80. Errante LD, Petroff OA. 2003. Acute effects of gabapentin and pregabalin on rat forebrain cellular GABA, glutamate, and glutamine concentrations. *Seizure* 12: 300-306.
81. Erzurumlu RS, Killackey HP. 1979. Efferent connections of the brainstem trigeminal complex with the facial nucleus of the rat. *J Comp Neurol* 188: 75-86.
82. Esser MJ, Pronych SP, Allen GV. 1998. Trigeminal-reticular connections: possible pathways for nociception-induced cardiovascular reflex responses in the rat. *J Comp Neurol* 391:526-544.
83. Falls WM. 1984. Termination in trigeminal nucleus oralis of ascending intratrigeminal axons originating from neurons in the medullary dorsal horn: an HRP study in the rat employing light and electron microscopy. *Brain Res* 290:136-140.
84. Falls WM, Moore BJ, Schneider MT. 1990. Fine structural characteristics and synaptic connections of trigeminocerebellar projection neurons in rat trigeminal nucleus oralis. *Somatosens Mot Res* 7: 1-18.
85. Fan W, Huang F, Zhu X, Dong W, Gao Z, Li D et al. 2010. Involvement of microglial activation in the brainstem in experimental dental injury and inflammation. *Arch Oral Biol* 55: 706-711.
86. Feil K, Herbert H. 1995. Topographic organization of spinal and trigeminal somatosensory pathways to the rat parabrachial and Kölliker-Fuse nuclei. *J Comp Neurol* 353:506-528.
87. Feldman SG, Kruger L. 1980. An axonal transport study of the ascending projection of medial lemniscus neurons in the rat. *J Comp Neurol* 192:427-454.
88. Fend M, Bovet S, Yokoi H, Pfeifer R. 2003. An active artificial whisker array for texture discrimination. *Proc IEEE/RSJ Int Conf Intelligent Robots and Systems (IROS)*, Las Vegas, Nevada. II: 1044-1049.
89. Feng Y, Cui M, Willis WD. 2003. Gabapentin markedly reduces acetic acid-induced visceral nociception. *Anesthesiology* 98: 729-733.
90. Fields HL. 1996. Treatment of trigeminal neuralgia. *N Engl J Med* 334: 1125-1126.
91. Fink BR, Aasheim G, Kish SJ, Croley TS. 1975. Neurokinetics of lidocaine in the infraorbital nerve of the rat in vivo. *Anesthesiology* 42: 731-736.
92. Fink K, Dooley DJ, Meder WP, Suman-Chahan N, Duffy S, Clusmann H, et al. 2002. Inhibition of neuronal Ca²⁺ influx by gabapentina and pregabalin in the human neocortex. *Neuropharmacology* 42; 229-236.
93. Flatters SJ, Bennett GJ. 2004. Ethosuximide reverses paclitaxel- and vincristine-induced painful peripheral neuropathy. *Pain* 109:150-161.
94. Fukushima T, Kerr FW. 1979. Organization of trigeminothalamic tracts and other thalamic afferent systems of the brainstem in the rat: presence of gelatinosa neurons with thalamic connections. *J Comp Neurol* 183:169-184.
95. Furuta T, Timofeeva E, Nakamura K, Okamoto-Furuta K, Togo M, Kaneko T et al. 2008. Inhibitory gating of vibrissal inputs in the brainstem. *J Neurosci*; 28: 1789-1797.
96. García-Fiñana M, Cruz-Orive LM. 2000a. New approximations for the variance in Cavalieri sampling. *J Microsc* 199: 224-238.
97. García-Fiñana M, Cruz-Orive LM. 2000b. Fractional trend of the variance in Cavalieri sampling. *Image Anal Stereol* 19:71-79.
98. Garry EM, Delaney A, Anderson HA, Sirinathsinghji EC, Clapp RH, Martin WJ, et al. 2005. Varicella zoster virus induces neuropathic changes in rat dorsal root ganglia and behavioral reflex sensitization that is attenuated by gabapentin or sodium channel blocking drugs. *Pain* 118; 97-111.

99. Gee NS, Brown JP, Dissanayake VU, Offord J, Thurlow R, Woodruff GN. 1996. The novel anticonvulsant drug, gabapentin (neurontin), binds to the $\alpha 2\delta$ subunit of a calcium channel. *J. Biol. Chem* 271: 5768–5776.
100. Geinisman Y, Gundersen HJG, Van der Zee E, West MJ. 1996. Unbiased stereological estimation of the total number of synapses in a brain region. *J Neurocytol* 25:805–819.
101. Gidal BE, Radulovic LL, Kruger S, Rutecki P, Pitterle M, Bockbrader HN. 2000. Inter- and intra-subject variability in gabapentina absorption and absolute bioavailability. *Epilepsy Res* 40:123-127.
102. Ginestal E, Matute C. 1993. Gamma-aminobutyric acid-immunoreactive neurons in the rat trigeminal nuclei. *Histochemistry* 99:49–55.
103. Goadsby PJ, Charbit AR, Andreou AP, Akerman S, Holland PR. 2009. Neurobiology of migraine. *Neuroscience* 161: 327-341.
104. Gosselin RD, Bebbler D, Decosterd I. 2010. Upregulation of the GABA transporter GAT-1 in the gracile nucleus in the spared nerve injury model of neuropathic pain. *Neurosci Lett* 480: 132-137.
105. Grant G, Arvidsson J, Robertson B, Ygge J. 1979. Transganglionic transport of horseradish peroxidase in primary sensory neurons. *Neurosci Lett* 12:23-28.
106. Greene EC. 1955. *Anatomy of the rat*. New York: Hafner.
107. Gu Y, Huang LYM. 1998. Gabapentin potentiates NMDA response in dorsal horn neurons treated with protein kinase C. *Soc Neurosci Abstr* 24: 640.
108. Guilbaud G, Benoist JM, Levante A, Gautron M, Willer JC. 1992. Primary somatosensory cortex in rats with pain-related behaviours due to a peripheral mononeuropathy after moderate ligation of one sciatic nerve: neuronal responsiveness to somatic stimulation. *Exp Brain Res* 92: 227-45.
109. Guillery RW. 2002. On counting and counting errors. *J Comp Neurol* 447:1–7.
110. Gundersen HJG, Bagger P, Bendtsen TF, Evans SM, Korbo L, Marcussen N, et al. 1988. The new stereological tools: disector, fractionator, nucleator and point sampled intercepts and their use in pathological research and diagnosis. *APMIS* 96: 857–881.
111. Gundersen HJG, Jensen EB. 1987. The efficiency of systematic sampling in stereology and its prediction. *J Microsc* 147: 229-263.
112. Guy N, Chalus M, Dalle R, Voisin DL. 2005. Both oral and caudal parts of the spinal trigeminal nucleus project to the somatosensory thalamus in the rat. *Eur J Neurosci* 21: 741-754.
113. Haenggeli CA, Pongstaporn T, Doucet JR, Ryugo DK. 2005. Projections from the spinal trigeminal nucleus to the cochlear nucleus in the rat. *J Comp Neurol*. 2005; 484: 191-205.
114. Hallas BH, Jacquin MF. 1990. Structure-function relationships in rat brain stem subnucleus interpolaris. IX. Inputs from subnucleus caudalis. *J Neurophysiol* 64: 28-45.
115. Han SK, Park SA, Jeon JG, Chang KW, Ahn DK, Oh SB et al. 2009. Functional type I vanilloid receptor expression by substantia gelatinosa neurons of trigeminal subnucleus caudalis in mice. *Neurosci Lett* 452: 228-231.
116. Han SK, Park JR, Park SA, Chun SW, Lee JC, Lee SY et al. 2006. Noradrenaline inhibits substantia gelatinosa neurons in mice trigeminal subnucleus caudalis via alpha(2) and beta adrenoceptors. *Neurosci Lett*. 2007; 411: 92-97.
117. Han SM, Ahn DK, Youn DH. 2008. Pharmacological analysis of excitatory and inhibitory synaptic transmission in horizontal brainstem slices preserving three subnuclei of spinal trigeminal nucleus. *J Neurosci Methods*; 167: 221-228.
118. Haring JH, Henderson TA, Jacquin MF. 1990. Principalis- or parabrachialprojecting spinal trigeminal neurons do not stain for GABA or GAD. *Somatosens Mot Res* 7: 391–397.
119. Hasbargen T, Ahmed MM, Miranpuri G, Li L, Kahle KT, Resnick D et al. 2010. Role of NKCC1 and KCC2 in the development of chronic neuropathic pain following spinal cord injury. *Ann N Y Acad Sci* 1198: 168-172.

120. Hasnie FS, Breuer J, Parker S, Wallace V, Blackbeard J, Lever I et al. 2007. Further characterization of a rat model of varicella zoster virus-associated pain: relationship between mechanical hypersensitivity and anxiety-related behavior, and the influence of analgesic drugs. *Neuroscience* 144: 1495-1508.
121. Heino R, Westman J. 1991. Quantitative analysis of the feline dorsal column nuclei and their GABAergic and non-GABAergic neurons. *Anat Embryol* 184: 181-193.
122. Hirata H, Okamoto K, Tashiro A, Bereiter DA. 2004. A novel class of neurons at the trigeminal subnucleus interpolaris/caudalis transition region monitors ocular surface fluid status and modulates tear production. *J Neurol* 24: 4224-4232.
123. Honmou O, Oyelese AA, Kocsis JD. 1995. The anticonvulsant gabapentin enhances promoted release of GABA in hippocampus: a field potential analysis. *Brain Res* 692: 273-277.
124. Hoot MR, Sim-Selley LJ, Poklis JL, Abdullah RA, Scoggins KL, Selley DE et al. 2010. Chronic constriction injury reduces cannabinoid receptor 1 activity in the rostral anterior cingulate cortex of mice. *Brain Res* 1339: 18-25.
125. Hossaini M, Duraku LS, Saraç C, Jongen JL, Holstege JC. 2010. Differential distribution of activated spinal neurons containing glycine and/or GABA and expressing c-fos in acute and chronic pain models. *Pain* 151: 356-365.
126. Howard CV, Reed MG. 1998. Unbiased stereology. Three-dimensional measurement in microscopy. Oxford: BIOS Scientific Publ.
127. Hu B, Chiang CY, Hu JW, Dostrovsky JO, Sessle BJ. 2002. P2X receptors in trigeminal subnucleus caudalis modulate central sensitization in trigeminal subnucleus oralis. *J Neurophysiol* 88: 1614-1624.
128. Hu B, Doods H, Treede RD, Ceci A. 2009. Depression-like behaviour in rats with mononeuropathy is reduced by the CB2-selective agonist GW405833. *Pain*; 143: 206-212.
129. Hu Y, Li W, Lu L, Cai J, Xian X, Zhang M et al. 2010. An anti-nociceptive role for ceftriaxone in chronic neuropathic pain in rats. *Pain*; 148: 284-301.
130. Huerta MF, Frankfurter A, Harting JK. 1983. Studies of the principal sensory and spinal trigeminal nuclei of the rat: projections to the superior colliculus, inferior olive, and cerebellum. *J Comp Neurol* 220; 147-167.
131. Huo FQ, Qu CL, Li YQ, Tang JS, Jia H. 2008. GABAergic modulation is involved in the ventrolateral orbital cortex 5-HT 1A receptor activation-induced antinociception in the rat. *Pain*. 139: 398-405.
132. Hwang JH, Yaksh TL. 1997. The effect of spinal GABA receptor agonists on tactile allodynia in a surgically-induced neuropathic pain model in the rat. *Pain* 70; 15-22.
133. Idänpään-Heikkilä JJ, Guilbaud G. 1999. Pharmacological studies on a rat model of trigeminal neuropathic pain: baclofen, but not carbamazepine, morphine or tricyclic antidepressants, attenuates the allodynia-like behaviour. *Pain* 79: 281-290.
134. Ikeda M, Tanami T, Matsushita M. 1984. Ascending and descending internuclear connections of the trigeminal sensory nuclei in the cat. A study with the retrograde and anterograde horseradish peroxidase technique. *Neuroscience* 12: 1243-1260.
135. Imamura Y, Kawamoto H, Nakanishi O. 1997. Characterization of heat-hyperalgesia in an experimental trigeminal neuropathy in rats. *Exp Brain Res*. 1997; 116: 97-103.
136. Irish PS, Iliakis B, Anderson NL, Westrum LE. 1996. Electron microscopic analysis of lesion-induced changes in synaptic structure and immunogold labeling of neurotransmitters within the feline trigeminal nucleus. *Synapse* 24: 48-59.
137. Jacquin MF. 1989c. Structure-function relationship in rat brainstem subnucleus interpolaris: V. Functional consequences of neonatal infraorbital nerve section. *J Comp Neurol* 282: 63-79.
138. Jacquin MF, Barcia M, Rhoades RW. 1989b. Structure-function relationships in rat brainstem subnucleus interpolaris: IV. Projection neurons. *J Comp Neurol* 282: 45-62.

139. Jacquin MF, Chiaia NL, Haring JH, Rhoades RW. 1990. Intersubnuclear connections within the rat trigeminal brainstem complex. *Somatosens Mot Res* 7: 399-420.
140. Jacquin MF, Golden J, Rhoades RW. 1989a. Structure-function relationships in rat brainstem subnucleus interpolaris. III. Local circuit neurons. *J Comp Neurol* 282: 24-44.
141. Jacquin MF, Mooney RD, Rhoades RW. 1986. Morphology, response properties, and collateral projections of trigeminothalamic neurons in the brainstem subnucleus interpolaris of rat. *Exp Brain Res* 61: 457-468.
142. Jacquin MF, Rana JZ, Miller MW, Chiaia NL, Rhoades RW. 1996. Development of trigeminal nucleus principalis in the rat: effects of target removal at birth. *Eur J Neurosci* 8: 1641-1657.
143. Jacquin MF, Renehan WE, Rhoades RW, Panneton WM. 1993. Morphology and topography of identified primary afferents in trigeminal subnuclei principalis and oralis. *J Neurophysiol* 70: 1911-1936.
144. Jacquin MF, Rhoades RW. 1990. Cell structure and response properties in the trigeminal subnucleus oralis. *Somatosens Motor Res* 7: 265-288.
145. Jacquin MF, Wiegand MR, Renehan WE. 1990b. Structure-function relationships in rat brain stem subnucleus interpolaris. VIII. Cortical inputs. *J Neurophysiol* 64: 3-27.
146. Jacquin MF, Zeigler HP. 1984. Trigeminal denervation and operant behavior in the rat. *Behav Neurosci* 98: 1004-1022.
147. Jonas P, Bischofberger J, Sandkühler J. 1998. Corelease of two fast neurotransmitters at a central synapse. *Science* 281: 419-24.
148. Jones LM, Depireux DA, Simons DJ, Keller A. 2004. Robust temporal coding in the trigeminal system. *Science* 304: 1986-1989.
149. Jun JH, Yaksh TL. 1998. The effect of intrathecal gabapentina and 3-isobutyl gamma-aminobutyric acid on the hyperalgesia observed after thermal injury in the rat. *Anesth Analg* 86: 348-354.
150. Kalaska J, Pomeranz B. Chronic peripheral nerve injuries alter the somatotopic organization of the cuneate nucleus in kittens. *Brain Res.* 1982; 236: 35-47.
151. Kalia LV, Kalia SK, Salter MW. 2008. NMDA receptors in clinical neurology: excitatory times ahead. *Lancet Neurol.* 7: 742-755.
152. Kangra I, Jiang MC, Randic M. 1991. Actions of (-)-baclofen on rat dorsal horn neurons. *Brain Res* 562: 265-275.
153. Karkar KM, Thio LL, Yamada KA. 2004. Effects of seven clinically important antiepileptic drugs on inhibitory glycine receptor currents in hippocampal neurons. *Epilepsy Res* 58: 27-35.
154. Kaufman DL, Houser CR, Tobin AJ. 1991. Two forms of the gamma-aminobutyric acid synthetic enzyme glutamate decarboxylase have distinct intraneuronal distributions and cofactor interactions. *J. Neurochem* 56, 720-723.
155. Kemplay S, Webster KE. 1989. A quantitative study of the projections of the gracile, cuneate and trigeminal nuclei and of the medullary reticular formation to the thalamus in the rat. *Neuroscience* 32: 153-168.
156. Kerr BJ, Bradbury EJ, Bennett DL, Trivedi PM, Dassan P, French J et al. 1999. Brain-derived neurotrophic factor modulates nociceptive sensory inputs and NMDA-evoked responses in the rat spinal cord. *J Neurosci* 19: 5138-5148.
157. Kim J, Kim SJ, Lee H, Chang JW. 2009. Effective neuropathic pain relief through sciatic nerve administration of GAD65-expressing rAAV2. *Biochem Biophys Res Commun* 388: 73-78.
158. Kim DS, Jung SJ, Nam TS, Jeon YH, Lee DR, Lee JS et al. 2010. Transplantation of Gabaergic Neurons from ES Cells Attenuates Tactile Hypersensitivity Following Spinal Cord Injury. *Stem Cells.* En prensa.
159. King T, Vera-Portocarrero L, Gutierrez T, Vanderah TW, Dussor G, Lai J et al. 2009. Unmasking the tonic-aversive state in neuropathic pain. *Nat Neurosci.* 12: 1364-1366.

160. Klein BG, Renehan WE, Jacquin MF, Rhoades RW. 1988. Anatomical consequences of neonatal infraorbital nerve transection upon the trigeminal ganglion and vibrissa follicle nerves in the adult rat. *J Comp Neurol* 268: 469-488.
161. Kocsis JD, Honmou O. 1994. Gabapentin increases GABA-induced depolarization in rat neonatal optic nerve. *Neurosci. Lett* 169: 181-184.
162. Kohno T, Moore KA, Baba H, Woolf CJ. 2003. Peripheral nerve injury alters excitatory synaptic transmission in lamina II of the rat dorsal horn. *J Physiol* 548: 131-138.
163. Königsmark BW. 1970. Methods for the counting of neurons. In Nauta WJH and Ebesson SOE, editors. *Contemporary Research Methods in Neuroanatomy*. New York: Springer-Verlag. P 315-340.
164. Kontinen VK, Meert TF. 2003. Predictive validity of neuropathic pain models in pharmacological studies with a behavioral outcome in the rat: a systematic review. In Dostrovsky JO, Carr DB, Koltzenburg M, editors. *Proceedings of the 10th World Congress of Pain*. Seattle: IASP Press p. 489-498.
165. Kossut M. 1998. Experience-dependent changes in function and anatomy of adult barrel cortex. *Exp Brain Res* 123: 110-116.
166. Kossut M, Juliano SL. 1999. Anatomical correlates of representational map reorganization induced by partial vibrissotomy in the barrel cortex of adult mice. *Neuroscience* 92 :807-17.
167. Kupers R, Danielsen ER, Kehlet H, Christensen R, Thomsen C. 2009. Painful tonic heat stimulation induces GABA accumulation in the prefrontal cortex in man. *Pain* 142: 89-93.
168. Kuzniecky R, Ho S, Pan J, Martin R, Gilliam F, Faught E et al. 2002. Modulation of cerebral GABA by topiramate, lamotrigine, and gabapentin in healthy adults. *Neurology* 58: 368-372.
169. Lagares A, Avendaño C. 2000. Lateral asymmetries in the trigeminal ganglion of the male rat. *Brain Res* 865: 202-210.
170. Laird JM, Bennett GJ. 1992. Dorsal root potentials and afferent input to the spinal cord in rats with an experimental peripheral neuropathy. *Brain Res* 584: 181-190.
171. Lamour Y, Wilier JC, Guilbaud G. 1983a. Rat somatosensory (SmI) cortex. I. Characteristics of neuronal responses to noxious stimulation and comparison with responses to non-noxious stimulation. *Exp Brain Res* 49: 35-45.
172. Lamour Y, Guilbaud G, Wilier JC. 1983b. Rat somatosensory (SmI) cortex. II. Laminar and columnar organization of noxious and nonnoxious input. *Exp Brain Res* 49: 46-54.
173. Langford DJ, Bailey AL, Chanda ML, Clarke SE, Drummond TE, Echols S et al. 2010. Coding of facial expressions of pain in the laboratory mouse. *Nat Methods* 7:447-449.
174. Li CY, Song YH, Higuera ES, Luo ZD. 2001. Spinal dorsal horn calcium channel $\alpha_2\delta$ -1 subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *J Neurosci* 21: 1868-1875.
175. Li H, Mizuno N. 1997. Single neurons in the spinal trigeminal and dorsal column nuclei project to both the cochlear nucleus and the inferior colliculus by way of axon collaterals: a fluorescent retrograde doublelabeling study in the rat. *Neurosci Res* 29:135-142.
176. Li JL, Wu SX, Tomioka R, Okamoto K, Nakamura K, Kaneko T et al. 2005. Efferent and afferent connections of GABAergic neurons in the supratrigeminal and the intertrigeminal regions. An immunohistochemical tract-tracing study in the GAD67-GFP knock-in mouse. *Neurosci Res* 51: 81-91.
177. Li YQ, Takada M, Kaneko T, Mizuno N. 1995. Premotor neurons for trigeminal motor nucleus neurons innervating the jaw-closing and jaw-opening muscles: differential distribution in the lower brainstem of the rat. *J Comp Neurol* 356: 563-579.
178. Li YQ, Takada M, Kaneko T, Mizuno N. 1996. GABAergic and glycinergic neurons projecting to the trigeminal motor nucleus: a double labeling study in the rat. *J Comp Neurol* 373: 498-510.

179. Li YQ, Takada M, Kaneko T, Mizuno N. 1997. Distribution of GABAergic and glycinergic premotor neurons projecting to the facial and hypoglossal nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 378: 283–294.
180. Li YQ, Tao FS, Okamoto K, Nomura S, Kaneko T, Mizuno N. 2002. The supratrigeminal region of the rat sends GABA/glycine-cocontaining axon terminals to the motor trigeminal nucleus on the contralateral side. *Neurosci Lett* 330: 13–16.
181. Lieberman AR. 1976. Sensory ganglia. In Landon DN, editor. *The peripheral nerve*. London: Chapman and Hall. P 188-278.
182. Lin JA, Lee MS, Wu CT, Yeh CC, Lin SL, Wen ZH et al. 2005. Attenuation of morphine tolerance by intrathecal gabapentina is associated with suppression of morphine-evoked excitatory amino acid release in the rat spinal cord. *Brain Res* 1054: 167-173.
183. Lisak RP, Skundric D, Bealmear B, Ragheb S. 1997. The role of cytokines in Schwann cell damage, protection, and repair. *J Infect Dis* 176 (Suppl 2): 173–179.
184. Loeser JD. 1994. Tic douloureux and atypical face pain. In: Wall PD, Melzack R, editors. *The textbook of pain*, 3rd ed. London: Churchill-Livingstone pp. 699-711.
185. Lombard MC, Nashold BS, Albe-Fessard D. 1979. Deafferentation hypersensitivity in the rat after dorsal rhizotomy: possible animal model for chronic pain. *Pain* 6: 163-174.
186. Lu CL, Chang FY, Hsieh JC. 2005. Is somatosensory cortex activated during proximal stomach stimulation and the role of insula in visceral pain. *Gastroenterology* 128: 1529-30.
187. Luo ZD, Chaplan SR, Higuera ES, Sorkin LS, Stauderman KA, Williams ME et al. 2001. Upregulation of dorsal root ganglion $\alpha 2\delta$ calcium channel subunit and its correlation with allodynia in spinal nerve-injured rats. *J. Neurosci* 21: 1868–1875.
188. Luo ZD, Calcutt NA, Higuera ES, Valder CR, Song YH, Svensson CI et al. 2002. Injury type-specific calcium channel $\alpha 2\delta$ -1 subunit up-regulation in rat neuropathic pain models correlates with antiallodynic effects of gabapentin. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 303: 1199–1205.
189. Lynch JJ, Honore P, Anderson DJ, Bunnelle WH, Mortell KH, Zhong C et al. 2006. (L)-Phenylglycine, but not necessarily other $\alpha 2\delta$ subunit voltage-gated calcium channel ligands, attenuates neuropathic pain in rats. *Pain* 125: 136–142.
190. Ma PM, 1991. The barrelettes architectonic vibrissal representations in the brainstem trigeminal complex of the mouse. I. Normal structural organization. *J Comp Neurol* 309:161-199.
191. Macfarlane TV, Blinkhorn AS, Davies RM, Ryan P, Worthington HV, Macfarlane GJ. 2002. Orofacial pain: just another chronic pain? Results from a population-based survey. *Pain* 99:453–458.
192. Machín R, Blasco B, Bjugn R, Avendaño C. 2004. The size of the whisker barrel field in adult rats: minimal nondirectional asymmetry and limited modifiability by chronic changes of the sensory input. *Brain Res* 1025: 130–138.
193. Mackie M, Hughes DI, Maxwell DJ, Tillakaratne NJ, Todd AJ. 2003. Distribution and colocalisation of glutamate decarboxylase isoforms in the rat spinal cord. *Neuroscience* 119: 461–472.
194. Maier DL, Grieb GM, Stelzner DJ, McCasland JS. 2003. Large-scale plasticity in barrel cortex following repeated whisker trimming in young adult hamsters. *Exp Neurol* 184: 737-745.
195. Maneuf YP, González MI, Sutton KS, Chung FZ, Smith de AR, Pruthi S, et al. 2003. Pilot evaluation of gabapentin for treating hot flashes. *Mayo Clin Proc* 77; 1159-1163.
196. Mantle-St John LA, Tracey DJ. 1987. Somatosensory nuclei in the brainstem of the rat: independent projections to the thalamus and cerebellum. *J Comp Neurol* 255: 259–271.
197. Mao J, Mayer DJ, Price DD. 1993. Patterns of increased brain activity indicative of pain in a rat model of peripheral mononeuropathy. *J Neurosci* 13: 2689-2702.
198. Malan TP, Mata HP, Porreca F. 2002. Spinal GABA(A) and GABA(B) receptor pharmacology in a rat model of neuropathic pain. *Anesthesiology* 96: 1161-1167.
199. Martin YB, Malmierca E, Avendaño C, Nuñez A. 2010. Neuronal disinhibition in the trigeminal nucleus caudalis in a model of chronic neuropathic pain. *Eur J Neurosci* 32: 399-408.

200. Marfurt CF, Rajchert DM. 1991. Trigeminal primary afferent projections to “non-trigeminal” areas of the rat central nervous system. *J Comp Neurol* 303: 489–511.
201. Marvizon JC, Grady EF, Stefani E, Bunnett NW, Mayer EA. 1999. Substance P release in the dorsal horn assessed by receptor internalization: NMDA receptors counteract a tonic inhibition by GABA(B) receptors. *Eur J Neurosci* 11: 417-426.
202. Matsushita M, Ikeda M, Okado N. 1982. The cells of origin of the trigeminothalamic, trigeminospinal and trigeminocerebellar projections in the cat. *Neuroscience* 7: 1439-1454.
203. Matute C, Streit P. 1986. Monoclonal antibodies demonstrating GABA-like immunoreactivity. *Histochemistry* 86: 147–157.
204. Maves TJ, Pechman PS, Gebhart GF, Meller ST. 1993. Possible chemical contribution from chronic gut sutures produces disorders of pain sensation like those seen in man. *Pain* 54: 57–69.
205. Meisner JG, Marsh AD, Marsh DR. 2010. Loss of GABAergic interneurons in laminae I-III of the spinal cord dorsal horn contributes to reduced GABAergic tone and neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurotrauma* 27: 729-737.
206. Melzer P, Smith CB. 1998. Plasticity of cerebral metabolic whisker maps in adult mice after whisker follicle removal. II. Modifications in the subcortical somatosensory system. *Neuroscience* 83:43–61.
207. Menétry D, De Pommery J, Baimbridge KG, Thomasset M. 1992. Calbindin-D28k (CaBP28k)-like immunoreactivity in ascending projections. I. Trigeminal nucleus caudalis and dorsal vagal complex projections. *Eur J Neurosci* 4: 61-69.
208. Mesulam MM. 1978. Tetramethylbenzidine for horseradish peroxidase neurohistochemistry. A non-carcinogenic blue-reaction product with superior sensitivity for visualizing neuronal afferents and efferents. *J Histochem Cytochem* 26:106–117.
209. Milligan ED, Watkins LR. 2009. Pathological and protective roles of glia in chronic pain. *Nat. Rev. Neurosci* 10: 23–36.
210. Miraucourt LS, Moisset X, Dallel R, Voisin DL. 2009. Glycine inhibitory dysfunction induces a selectively dynamic, morphine-resistant, and neurokinin 1 receptor- independent mechanical allodynia. *J Neurosci* 29: 2519-2527.
211. Mogil JS. 2013. Pain 2010. An updated review. Montreal, Québec.
212. Mogil JS, Chanda ML. 2005. The case for the inclusion of female subjects in basic science studies of pain. *Pain* 117; 1-5.
213. Molinari HH, Schultze KE, Strominger NL. 1996. Gracile, cuneate, and spinal trigeminal projections to inferior olive in rat and monkey. *J Comp Neurol* 375: 467–480.
214. Monassi CR, Bandler R, Keay KA. 2003. A subpopulation of rats show social and sleep-waking changes typical of chronic neuropathic pain following peripheral nerve injury. *Eur J Neurosci* 17: 1907-1920.
215. Moore KA, Kohno T, Karchewski LA, Scholz J, Baba H, Woolf CJ. 2002. Partial peripheral nerve injury promotes a selective loss of GABAergic inhibition in the superficial dorsal horn of the spinal cord. *J. Neurosci* 22: 6724–6731.
216. Moore JK, Osen KK, Storm-Mathisen J, Ottersen OP. 1996. Gammaaminobutyric acid and glycine in the baboon cochlear nuclei: an immunocytochemical colocalization study with reference to interspecies differences in inhibitory systems. *J Comp Neurol* 369: 497–519.
217. Naik AK, Pathirathna S, Jevtovic-Todorovic V. 2008. GABAA receptor modulation in dorsal root ganglia in vivo affects chronic pain after nerve injury. *Neuroscience* 154: 1539-1553.
218. Nakai K, Nakae A, Oba S, Mashimo T, Ueda K. 2010. P2X4 receptor expression in a rat model of trigeminal neuropathic pain. *Neuroreport* 21: 559-563.
219. Nasution ID, Shigenaga Y. 1987. Ascending and descending internuclear projections within the trigeminal sensory nuclear complex. *Brain Res* 425: 234-247.

220. Negredo P, Martin YB, Lagares A, Castro J, Villacorta JA, Avendaño C. 2009. Trigeminothalamic barrelette neurons: natural structural side asymmetries and sensory input-dependent plasticity in adult rats. *Neuroscience* 163: 1242-1254.
221. Nicoletis MAL, Chapin JK, Lin RCS. 1992. Somatotopic maps within the zona incerta relay parallel GABAergic somatosensory pathways to the neocortex, superior colliculus and brainstem. *Brain Res* 577: 134-141.
222. Okamoto K, Imbe H, Kimura A, Donishi T, Tamai Y, Senba E. 2007. Activation of central 5HT_{2A} receptors reduces the craniofacial nociception of rats. *Neuroscience* 147: 1090-1102.
223. Okamoto K, Tashiro A, Chang Z, Bereiter DA. 2010. Bright light activates a trigeminal nociceptive pathway. *Pain* 149: 235-242.
224. Olzewski J. 1950. On the anatomical and functional organization of the spinal trigeminal nucleus. *J Comp Neurol* 92: 401-413.
225. Ottersen OP, Storm-Mathisen J. 1984. Glutamate- and GABA-containing neurons in the mouse and rat brain, as demonstrated with a new immunocytochemical technique. *J Comp Neurol* 229: 374-392.
226. Ottersen OP, Storm-Mathisen J, Somogyi P. 1988. Colocalization of glycine-like and GABA-like immunoreactivities in Golgi cell terminals in the rat cerebellum: a postembedding light and electron microscopic study. *Brain Res* 450: 342-353.
227. Ouyang C, Guo L, Lu Q, Xu X, Wang H. 2007. Enhanced activity of GABA receptors inhibits glutamate release induced by focal cerebral ischemia in rat striatum. *Neurosci Lett* 420: 174-178.
228. Park JH, Han JB, Kim SK, Park JH, Go DH, Sun B et al. 2010. Spinal GABA receptors mediate the suppressive effect of electroacupuncture on cold allodynia in rats. *Brain Res* 1322: 24-29.
229. Park HJ, Joo HS, Chang HW, Lee JY, Hong SH, Lee Y, Moon DE. 2010. Attenuation of neuropathy-induced allodynia following intraplantar injection of pregabalin. *Can J Anaesth* 57: 664-671.
230. Park ES, Kim SY, Youn DH. 2010. NMDA receptor, PKC and ERK prevent fos expression induced by the activation of group I metabotropic glutamate receptors in the spinal trigeminal subnucleus oralis. *Mol Cells*. En prensa.
231. Pascual-Gómez. 2009. Papel de los neuromoduladores en el tratamiento preventivo de la migraña. *Rev Neurol* 2009; 49: 25-32.
232. Patel MK, González MI, Bramwell S, Pinnock RD, Lee K. 2000. Gabapentin inhibits excitatory synaptic transmission in the hyperalgesic spinal cord. *Br. J. Pharmacol* 130: 1731-1734.
233. Patrick GW, Robinson MA. 1987. Collateral projections from trigeminal sensory nuclei to ventrobasal thalamus and cerebellar cortex in rats. *J Morphol* 192: 229-236.
234. Paxinos G, Carrive P, Wang P-Y. 1999. Chemoarchitectonic atlas of rat brainstem. San Diego: Academic Press.
235. Paxinos G, Watson C. 1988. The rat brain in stereotaxic coordinates. Centrecourt, Australia: Academic Press.
236. Peschanski M. 1984. Trigeminal afferents to the diencephalon in the rat. *Neuroscience* 12; 465-487.
237. Petroff OA, Hyder F, Rothman DL, Mattson RH. 2000. Effects of gabapentin on brain GABA, homocarnosine, and pyrrolidinone in epilepsy patients. *Epilepsia* 41: 675-80.
238. Petty BG, Cornblath DR, Adornato BT, Chaudhry V, Flexner C, Wachsmann M et al. 1994. The effect of systemically administered recombinant human nerve growth factor in healthy human subjects. *Ann Neurol* 36: 244-246.

239. Pfeiffer F, Simler R, Grenningloh G, Betz H. 1984. Monoclonal antibodies and peptide mapping reveal structural similarities between the subunits of the glycine receptor of rat spinal cord. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 81: 7224–7227
240. Phelan KD, Falls WM. 1991. The spinotrigeminal pathway and its spatial relationship to the origin of trigeminospinal projections in the rat. *Neuroscience* 40:477–496.
241. Pickering G, Jourdan D, Millecamps M, Chapuy E, Alliot J, Eschalier A. 2006. Age-related impact of neuropathic pain on animal behavior. *Eur J Pain* 10: 749-755.
242. Pierret T, Lavallée P, Deschênes M. 2000. Parallel streams for the relay of vibrissal information through thalamic barreloids. *J Neurosci* 20: 7455-7462.
243. Pinganaud G, Bernat I, Buisseret P, Buisseret-Delmas C. 1999. Trigeminal projections to hypoglossal and facial motor nuclei in the rat. *J Comp Neurol* 415: 91–104.
244. Pinto ML, de Cássia Machado R, Schoorlemmer GH, Colombari E, de Cássia Ribeiro da Silva Lapa R. 2006. Topographic organization of the projections from the interstitial system of the spinal trigeminal tract to the parabrachial nucleus in the rat. *Brain Res.* 2006; 1113: 137-145.
245. Polgár E, Antal M. 1995. The colocalization of parvalbumin and calbindin-D28k with GABA in the subnucleus caudalis of the rat spinal trigeminal nucleus. *Exp Brain Res* 103: 402-408.
246. Polgár E, Gray S, Riddell JS, Todd AJ. 2004. Lack of evidence for significant neuronal loss in laminae I-III of the spinal dorsal horn of the rat in the chronic constriction injury model. *Pain*, 111: 144–150.
247. Polgár E, Thomson S, Maxwell DJ, Al-Khater K, Todd AJ. 2007. A population of large neurons in laminae III and IV of the rat spinal cord that have long dorsal dendrites and lack the neurokinin 1 receptor. *Eur J Neurosci* 26: 1587–1598.
248. Polgár E, Todd AJ. Tactile allodynia can occur in the spared nerve injury model in the rat without selective loss of GABA or GABA_A receptors from synapses in laminae I-II of the ipsilateral spinal dorsal horn. *Neuroscience*. Doi:10.1016/j.neuroscience.2008.07.009.
249. Popratiloff A, Valtchanoff JG, Rustioni A, Weinberg RJ. 1996. Colocalization of GABA and glycine in the rat dorsal column nuclei. *Brain Res* 706: 308–312.
250. Powell JJ, Todd AJ. 1992. Light and electron microscope study of GABA-immunoreactive neurones in lamina III of rat spinal cord. *J. Comp. Neurol.* 315: 125–136.
251. Qu CL, Tang JS, Jia H. 2006. Involvement of GABAergic modulation of antinociception induced by morphine microinjected into the ventrolateral orbital cortex. *Brain Res* 1073-1074.
252. Quiton RL, Masri R, Thompson SM, Keller A. 2010. Abnormal activity of primary somatosensory cortex in central pain syndrome. *J Neurophysiol* 104: 1717-1725.
253. Price DD, Greenspan JD, Dubner R. 2003. Neurons involved in the exteroceptive function of pain. *Pain* 106: 215-219.
254. Ramón y Cajal S. 1911. *Histologie du system nerveux de l’homme et des vertébrés.* A. Maloine, Paris.
255. Rampon C, Luppi PH, Fort P, Peyron C, Jouvet M. 1996. Distribution of glycine-immunoreactive cell bodies and fibers in the rat brain. *Neuroscience* 75:737–755.
256. Ressot C, Collado V, Molat JL, Dallel R. 2001. Strychnine alters response properties of trigeminal nociceptive neurons in the rat. *J. Neurophysiol* 86: 3069–3072.
257. Rhoades RW, Chiaia NL, Mooney RD, Klein BG, Renehan WE, Jacquin MF. 1987. Reorganization of the peripheral projections of the trigeminal ganglion following neonatal transection of the infraorbital nerve. *Somatosens Res*; 5: 35-62.
258. Ribeiro-da-Silva A, Cuello AC. 1995. Organization of peptidergic neurons in the dorsal horn of the spinal cord: anatomical and functional correlates. *Prog Brain Res* 104: 41-59.
259. Rice ASC, Maton S; Postherpetic Neuralgia Study Group. 2001. Gabapentin in postherpetic neuralgia; a randomized, double-blind, controlled study. *Pain* 94; 215-24.

260. Riquelme R, Saldaña E, Osen KK, Ottersen OP, Merchán MA. 2001. Colocalization of GABA and glycine in the ventral nucleus of the lateral lemniscus in rat: an in situ hybridization and semiquantitative immunocytochemical study. *J Comp Neurol* 434: 409–424.
261. Rosner H, Rubin L, Kestenbaum A. 1996 Gabapentin adjunctive therapy in neuropathic pain states. *Clin J Pain* 12: 56-58.
262. Rustioni A, Schmechel DE, Cheema S, Fitzpatrick D. 1984. Glutamic acid decarboxylase-containing neurons in the dorsal column nuclei of the cat. *Somatosens Res* 1: 329–357.
263. Saporta S, Kruger L. 1977. The organization of thalamocortical relay neurons in the rat ventrobasal complex studied by the retrograde transport of horseradish peroxidase. *J Comp Neurol* 174: 187-208.
264. Schreihöfer AM, Stornetta RL, Guyenet PG. 1999. Evidence for glycinergic respiratory neurons: Bötzinger neurons express mRNA for glycinergic transporter 2. *J Comp Neurol* 407: 583-597.
265. Scott FT, Leedham-Green ME, Barrett-Muir WY, Hawrani K, Gallagher WJ, Johnson R et al. 2003. A study of shingles and the development of postherpetic neuralgia in East London. *J Med Virol* 2003; 70 (Suppl 1): S24-30.
266. Sedlacek M, Horak M, Vyklický L Jr. 2007. Morphology and physiology of lamina I neurons of the caudal part of the trigeminal nucleus. *Neuroscience* 147: 325-333.
267. Shammah-Lagnado SJ, Costa MS, Ricardo JA. 1992. Afferent connections of the parvocellular reticular formation: a horseradish peroxidase study in the rat. *Neuroscience* 50: 403–425.
268. Shimoyama M, Shimoyama N, Hori Y. 1998. Gabapentin affects synaptically-evoked NMDA current in rat dorsal horn neurons. *Soc Neurosci Abstr* 24: 639.
269. Shimoyama M, Shimoyama N, Hori Y. 2000. Gabapentin affects glutamatergic excitatory neurotransmission in the rat dorsal horn. *Pain* 85, 405–414.
270. Shortland PJ, Demaro JA, Shang F, Waite PME, Jacquin MF. 1996. Peripheral and central predictors of whisker afferent morphology in the rat brainstem. *J Comp Neurol* 375: 481–501.
271. Shupliakov O, Ornung G, Brodin L, Ulfhake B, Ottersen OP, Storm-Mathisen J et al. 1993. Immunocytochemical localization of amino acid neurotransmitter candidates in the ventral horn of the cat spinal cord: a light microscopic study. *Exp Brain Res* 96: 404–418.
272. Sigel E. 1995. Functional modulation of ligand-gated GABAA and NMDA receptor channels by phosphorylation. *J Recept Signal Transduct Res* 15: 325-332.
273. Soghomonian JJ, Martin DL. 1998. Two isoforms of glutamate decarboxylase: why? *Trends Pharmacol. Sci* 19, 500–505.
274. Sokal DM, Chapman V. 2003. Inhibitory effects of spinal baclofen on spinal dorsal horn neurons in inflamed and neuropathic rats in vivo. *Brain Res* 987: 67-75.
275. Somogyi J. 2002. Differences in ratios of GABA, glycine and glutamate immunoreactivities in nerve terminals on rat hindlimb motoneurons: a possible source of post-synaptic variability. *Brain Res Bull* 59: 151–161.
276. Somogyi P, Hodgson AJ, Smith AD, Nunzi MG, Gorio A, Wu JY. 1984. Different populations of GABAergic neurons in the visual cortex and hippocampus of cat contain somatostatin- or cholecystininimmunoreactive material. *J Neurosci* 4: 2590–2603.
277. Sorkin LS, Puig S, Jones DL. 1998. Spinal bicuculline produces hypersensitivity of dorsal horn neurons: effects of excitatory amino acid antagonists. *Pain* 77: 181–190.
278. Spirou GA, Berrebi AS. 1997. Glycine immunoreactivity in the lateral nucleus of the trapezoid body of the cat. *J Comp Neurol* 383: 473–488.
279. Stefani A, Spadoni F, Bernardi G. 1998. Gabapentin inhibits calcium currents in isolated rat brain neurons. *Neuropharmacology*. 37: 83-91.
280. Steindler DA. 1985. Trigemino-cerebellar, trigeminotectal, and trigeminothalamic projections: a double retrograde axonal tracing study in the mouse. *J Comp Neurol* 237: 155-75.

281. Sterio DC. 1984. The unbiased estimation of number and sizes of arbitrary particles using the disector. *J Microsc* 134: 127–136.
282. Stewart DW, Buffington PJ, Wacksman J. 1990. Suture material in bladder surgery: a comparison of polydioxanone, polyglactin, and chromic catgut. *J Urol* 143:1261-1263.
283. Su TZ, Lunney E, Campbell G, Oxender DL. 1995. Transport of gabapentin, a γ -amino acid drug, by system alpha-amino acid transporters: a comparative study in astrocytes, synaptosomes, and CHO cells. *J Neurochem* 64: 2125-2131.
284. Sung YJ, Ambron RT. 2004. Pathways that elicit long-term changes in gene expression in nociceptive neurons following nerve injury: contributions to neuropathic pain. *Neurol Res* 26: 195-203.
285. Sweet WH. 1984. Deafferentation pain after posterior rhizotomy, trauma to a limb, and herpes zoster. *Neurosurgery* 15: 928-932.
286. Szwed M, Bagdasarian K, Ahissar E. 2003. Encoding of vibrissal active touch. *Neuron* 40:621–630.
287. Takasu K, Ono H, Tanabe M. 2008. Gabapentin produces PKA-dependent pre-synaptic inhibition of GABAergic synaptic transmission in LC neurons following partial nerve injury in mice. *J Neurochem* 105: 933-42.
288. Takeda M, Tanimoto T, Matsumoto S. 2000. Change in mechanical receptive field properties induced by GABA(A) receptor activation in the trigeminal spinal nucleus caudalis neurons in rats. *Exp. Brain Res* 134: 409–416.
289. Takemura M, Sugimoto T, Shigenaga Y. 1991. Difference in central projection of primary afferents innervating facial and intraoral structures in the rat. *Exp Neurol* 111: 324-331.
290. Tanaka I, Ezure K, Kondo M. 2003. Distribution of glycine transporter 2 mRNA-containing neurons in relation to glutamic acid decarboxylase mRNA-containing neurons in rat medulla. *Neurosci Res* 47: 139-151.
291. Tashiro A, Okamoto K, Chang Z, Bereiter DA. 2010. Behavioral and neurophysiological correlates of nociception in an animal model of photokeratitis. *Neuroscience* 169: 455-462.
292. Taylor CP, Vartanian MG, Andruszkiewicz R, Silverman RB. 1992. 3-alkyl GABA and 3-alkylglutamic acid analogues: two new classes of anticonvulsant agents. *Epilepsy Res* 11:103-110.
293. Timofeeva E, Lavallee P, Arsenaault D, Deschenes M. 2004. Synthesis of multiwhisker-receptive fields in subcortical stations of the vibrissa system. *J Neurophysiol* 91: 1510-1515.
294. Todd AJ. 1996. GABA and glycine in synaptic glomeruli of the rat spinal dorsal horn. *Eur J Neurosci* 8: 2492–2498.
295. Todd A, Koerber H. 2006. Neuroanatomical substrates of spinal nociception. In McMahon, S. & Koltzenburg, M. (eds), *Wall and Melzack's Textbook of Pain*. Elsevier, Philadelphia, pp. 73–90.
296. Todd AJ, Spike RC. 1993. The localization of classical transmitters and neuropeptides within neurons in laminae I-III of the mammalian spinal dorsal horn. *Prog Neurobiol* 41: 609-645.
297. Tsuboi A, Kolta A, Chen CC, Lund JP. 2003. Neurons of the trigeminal main sensory nucleus participate in the generation of rhythmic motor patterns. *Eur J Neurosci* 17:229–238.
298. Tsubokawa T, Katayama Y, Hirayama T. 1987. Effects of thalamic sensory relay nucleus stimulation on trigeminal subnucleus caudalis neurons in the cat--abnormal bursting hyperactivity after trigeminal rhizotomy. *Neurol Med Chir (Tokyo)* 27: 601-606.
299. Turman J Jr, Chandler SH. 1994. Immunohistochemical evidence for GABA and glycine-containing trigeminal premotoneurons in the guinea pig. *Synapse* 18:7–20.
300. Uceyler N, Sommer C. 2008. Cytokine regulation in animal models of neuropathic pain and in human diseases. *Neurosci Lett* 437: 194–198.
301. Uff CR, Scott AD, Pockley AG, Phillips RK. 1995. Influence of soluble suture factors on in vitro macrophage function. *Biomaterials* 16: 355-60.

302. Urban MO, Ren K, Park KT, Campbell B, Anker N, Stearns B et al. 2005. Comparison of the antinociceptive profiles of gabapentin and 3-methylgabapentin in rat models of acute and persistent pain: implications for mechanism of action. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 313: 1209–1216.
303. Van del Loos H. 1976. Barreloids in mouse somatosensory thalamus. *Neurosci Lett* 2, 1-6.
304. Veinante P, Deschênes M. 1999. Single- and multiwhisker channels in the ascending projections from the principal trigeminal nucleus in the rat. *J Neurosci* 19: 5085-5095.
305. Veinante P, Jacquin MF, Deschênes M. 2000. Thalamic projections from the whisker-sensitive regions of the spinal trigeminal complex in the rat. *J Comp Neurol* 420:233–243.
306. Velázquez KT, Mohammad H, Sweitzer SM. 2007. Protein kinase C in pain: involvement of multiple isoforms. *Pharmacol Res* 55: 578-589.
307. Vernon H, Sun K, Zhang Y, Yu XM, Sessle BJ. 2009. Central sensitization induced in trigeminal and upper cervical dorsal horn neurons by noxious stimulation of deep cervical paraspinal tissues in rats with minimal surgical trauma. *J Manipulative Physiol Ther* 32: 506-514.
308. Vicent SB. 1912. The function of the vibrissae in the behavior of the white rat. *Behavior Monographs*, 1: 1-81.
309. Voisin DL, Dome´jean-Orliaguet S, Chalus M, Dallel R, Woda A. 2002. Ascending connections from the caudal part to the oral part of the spinal trigeminal nucleus in the rat. *Neuroscience* 109:183–193.
310. Vos BP, Hans G, Adriaensen H. 1998. Behavioral assessment of facial pain in rats: face grooming patterns after painful and non-painful sensory disturbances in the territory of the rat's infraorbital nerve. *Pain* 76: 173-178.
311. Vos BP, Strassman AM, Maciewicz RJ. 1994. Behavioral evidence of trigeminal neuropathic pain following chronic constriction injury to the rat's infraorbital nerve. *J Neurosci* 14: 2708-2723.
312. Waite PM. 1984. Rearrangement of neuronal responses in the trigeminal system of the rat following peripheral nerve section. *J Physiol*; 352: 425-445.
313. Waite PME, Tracey DJ. 1995. Trigeminal sensory system. In: Paxinos G, editor. *The rat nervous system*. San Diego: Academic Press. p 705–724.
314. Wallace VC, Segerdahl AR, Blackbeard J, Pheby T, Rice AS. 2008. Anxiety-like behaviour is attenuated by gabapentin, morphine and diazepam in a rodent model of HIV anti-retroviral-associated neuropathic pain. *Neurosci Lett* 448: 153-156.
315. Wang D, Li YQ, Li JL, Kaneko T, Nomura S, Mizuno N. 2000. Gamma- Aminobutyric acid- and glycine-immunoreactive neurons postsynaptic to substance P-immunoreactive axon terminals in the superficial layers of the rat medullary dorsal horn. *Neurosci Lett* 288:187–190.
316. Wang S, Lim G, Mao J, Sung B, Mao J. 2009. Regulation of the trigeminal NR1 subunit expression induced by inflammation of the temporomandibular joint region in rats. *Pain* 141: 97-103.
317. Welker E, Soriano E, Dorfl J, Van der Loos H. 1989a. Plasticity in the barrel cortex of the adult mouse - Transient increase of GAD-immunoreactivity following sensory stimulation. *Exp.Brain Res* 78: 659-664.
318. Welker E, Soriano E, Van der Loos H. 1989b. Plasticity in the barrel cortex of the adult mouse: Effects of peripheral deprivation on GAD-immunoreactivity. *Exp.Brain Res* 74: 441-452.
319. West MJ, Slomianka L, Gundersen HJG. 1991. Unbiased stereological estimation of the total number of neurons in the subdivisions of the rat hippocampus using the optical fractionator. *Anat Rec* 231: 482–497.
320. Williams MN, Zahm DS, Jacquin MF. 1994. Differential foci and synaptic organization of the principal and spinal trigeminal projections to the thalamus in the rat. *Eur J Neurosci* 6:429–453.
321. Willis WD. 1985. *The pain system*. New York: Karger.
322. Willis WD, Coggeshall RE. 1978. *Sensory mechanisms of the spinal cord*. New York: Plenum Press.

323. Willis WD, Westlund KN. 1997. Neuroanatomy of the pain system and of the pathways that modulate pain. *J Clin Neurophysiol* 14: 2-31.
324. Woolf CJ. 1997. Molecular signals responsible for the reorganisation of the synaptic circuitry of the dorsal horn after peripheral nerve injury: the mechanisms of tactile allodynia. In Borsook, D. (Ed), *Molecular neurobiology of pain*. IASP, Seattle, pp. 171–200.
325. Woolf CJ, Mannion RJ. 1999. Neuropathic pain: aetiology, symptoms, mechanisms and management. *Lancet* 353: 1959-1964.
326. Woolf CJ, Salter MW. 2000. Neuronal plasticity: increasing the gain in pain. *Science* 288: 1765-1769.
327. Woolf CJ, Wall PD. 1982. Chronic peripheral nerve section diminishes the primary afferent A-fibre mediated inhibition of rat dorsal horn neurones. *Brain Res* 242: 77-85.
328. Woolsey TA, Wann JR. 1976. Areal changes in mouse cortical barrels following vibrissal damage at different postnatal ages. *J Comp Neurol* 170: 53-66.
329. Wong-Riley MTT. 1979. Changes in the visual system of monocularly sutured or enucleated cats demonstrable with cytochrome oxidase histochemistry. *Brain Res* 171: 11–28.
330. Wrigley PJ, Press SR, Gustin SM, Macefield VG, Gandevia SC, Cousins MJ et al. 2009. Neuropathic pain and primary somatosensory cortex reorganization following spinal cord injury. *Pain* 141: 52-59.
331. Wu H, Jin Y, Buddhala C, Osterhaus G, Cohen E, Jin H et al. 2007. Role of glutamate decarboxylase (GAD) isoform, GAD65, in GABA synthesis and transport into synaptic vesicles-Evidence from GAD65-knockout mice studies. *Brain Res* 1154: 80–83.
332. Xu Y, Oz G, LaNoue KF, Keiger CJ, Berkich DA, Gruetter R, et al. 2004. Whole-brain glutamate metabolism evaluated by steady-state kinetics using a double-isotope procedure: effects of gabapentin. *J Neurochem* 90; 1104-1116.
333. Yatim N, Billig I, Compoin C, Buisseret P, Buisseret-Delmas C. 1996. Trigemino-cerebellar and trigemino-olivary projections in rats. *Neurosci Res* 25: 267–283.
334. Yoon MH, Choi JI, Jeong SW. 2003. Spinal gabapentin and antinociception: mechanisms of action. *J Korean Med Sci* 18: 255-261.
335. Yoshida A, Dostrovsky JO, Sessle BJ, Chiang CY. 1991. Trigeminal projections to the nucleus submedialis of the thalamus in the rat. *J Comp Neurol* 307: 609-625.
336. Yoshida A, Sessle BJ, Dostrovsky JO, Chiang CY. 1992. Trigeminal and dorsal column nuclei projections to the anterior pretectal nucleus in the rat. *Brain Res* 590: 81–94.
337. Yoshida A, Hiraga T, Moritani M, Chen K, Takatsuki Y, Hirose Y, Bae YC, Shigenaga Y. 1998. Morphologic characteristics of physiologically defined neurons in the cat trigeminal nucleus principalis. *J Comp Neurol* 401: 308–328.
338. Zarbin MA, Wamsley JK, Kuhar M. 1981. Glycine receptor: light microscopic autoradiographic localization with [³H] strychnine. *J. Neurosci* 1: 532–547.
339. Zeilhofer HU. 2008. Loss of glycinergic and GABAergic inhibition in chronic pain--contributions of inflammation and microglia. *Int Immunopharmacol* 8: 182-187.
340. Zeilhofer HU. 2005. The glycinergic control of spinal pain processing. *Cell Mol Life Sci* 62: 2027-2035.
341. Zhang X, Bao L. 2006. The development and modulation of nociceptive circuitry. *Curr Opin Neurobiol* 16: 460-466.
342. Zheng J, Lu Y, Perl ER. 2010. Inhibitory neurones of the spinal substantia gelatinosa mediate interaction of signals from primary afferents. *J Physiol* 588: 2065-2075.

8. PUBLICACIONES RELACIONADAS CON LA TESIS
